REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA

VOLUME 3 MARÇO, 1943 NÚMERO 1

TARDÍGRADOS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL
III. Gêneros "Hypsibius", "Itaquascon" e "Milnesium" [1]

ROSINA DE BARROS

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, S. Paulo

(Com 27 figuras no texto)

Hypsibius (*Isohypsibius*) *nodosus* (J. Murr., 1907)
(Figs. 1-3)

Hypsibius (*Isohypsibius*) *nodosus* Marcus, 1936, p. 242, fig. 241

Tamanho do corpo muito variavel : ora pequeno, ora grande. São alaranjados com pigmentos visuais pretos. Cutícula do corpo formada de papilas fundidas na parte basal ou separadas em gibas dispostas simetricamente à linha mediana em 7-9 faixas tranversais. Existem em número de 2 a 6 na primeira faixa; 4, na segunda faixa (ao nivel do 1.º par de patas) ; 0-6 na terceira faixa; 4-6 nas quarta e sexta faixas (sôbre os 2.º e 3.º pares de patas), respectivamente; 0-4 na quinta faixa; 2 fundidas e até 4 separadas na sétima faixa; 2-4 na oitava e 2 na nona faixa (em cima do 4.º par de patas). Entre as gibas a cutícula é lisa ou verrucosa. Numa das populações observei que a reticulação proveniente das verruguinhas compõe-se de malhas maiores que as ordinariamente encontradas nesta espécie. Tubo bucal estreito. Processos de inserção muscular em forma de crista. Faringe oval; o seu maior diâmetro mede 50 μ. Possue dois macroplacóides, dos quais o 1.º tem quase o dobro do comprimento do 2.º. Não há microplacóide. Garras pequenas (30 μ de comprimento nos exemplares maiores) e desiguais. O ramo principal de cada garra mostra duas pontas acessórias. Comprimento do corpo : acima de 500 μ (na população com a particularidade descrita : 261 μ, no máximo).

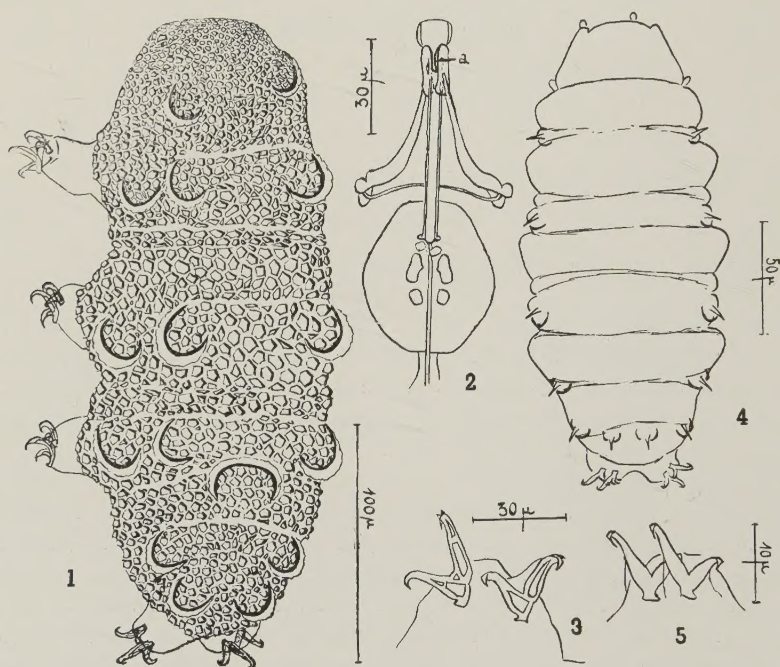
Ovos elipsóidicos (68 μ : maior diâmetro), brancos ou alaranjados.

Brasil, Estado de S. Paulo : várias localidades. Bolívia (1.000 a 2.000 m.). Europa central. África oriental e meridional. Java (3.000 m.), Lombok, ilhas do Pacífico, Nova Zelândia, ilhas das Macquaries.

---

[1] Recebido para publicação a 20 de Junho de 1942.
Trabalho da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de S. Paulo, publicado em três partes nesta mesma REVISTA; a primeira com o subtítulo : I. Introdução. Gêneros "Echiniscus" e "Pseudechiniscus", *Rev. Brasil. Biol.*, 2(3) : 257-269, figs. 1-21; e a segunda com o subtítulo : II. Gênero "Macrobiotus", *Rev. Brasil, Biol.*, 2(4) : 373-386, figs. 1-52.

A população com cutícula finamente papilosa, à qual fiz referência na parte descritiva, corresponde à variedade da África oriental não denominada por MURRAY (1913, p. 140), mais tarde (MARCUS, 1936, p. 242), incluida na sinonímia da espécie. A reticulação da cutícula em *H. sattleri* (Richters, 1902) é mais espessa e as gibas, tambem, são diferentes. Em *H. sattleri* as séries transversais das gibas pouco nítidas (CUÉNOT, 1932, p. 80) aparecem, principalmente, na metade caudal (MURRAY, 1907, t. 4, fig. 26-a; RICHTERS, 1911 *a*, t. 2, fig. 14). Em *H. nodosus* as gibas formam séries transversais nítidas que deixam livre uma linha mediana longitudinal. Como se vê na fig 1, a disposição par das gibas em *H. nodosus* pode desaparecer pela fusão de duas gibas,



Hypsibius (*Isohypsibius*) *nodosus* (J. Murray) — Fig. 1 : Vista dorso-lateral; fig 2 : faringe (*a* — processos de inserção muscular em forma de crista); fig. 3 : garras. *Hypsibius* (*Isohypsibius*) *papillifer* (J. Murray) — Fig. 4 : Vista dorsal; fig. 5 : garras.

as quais frequentemente se tocam pela base. A largura desta giba revela a sua origem pela confluência aludida. Em geral, a escultura do meu material é relativamente grossa. Notei em certos animais uma dilatação do tubo bucal, representada na figura original (MURRAY, 1907 *a*, t. 18, fig. 6 *b*), mas não mencionada no texto correspondente (*l. c.*, p. 523). Os placóides de meus espécimes são mais curtos e mais largos que os dos sulafricanos e bem diferentes dos observados no material alemão (MARCUS, 1936, fig. 241 *D*). Dos *Isohypsibius* com escultura semelhante, *H. tuberculatus* (Plate, 1888), possue dez séries transversais de tubérculos, das quais a primeira e a décima são ímpares. *H. tu-*

berculatus, forma *giba* (MARCUS, 1928; p. 187) tem verrugas irregulares, três placóides e não apresenta pigmentos visuais.

Hypsibius (*Isohypsibius*) *papillifer* (J. Murr., 1905) (Figs. 4-5)

Hypsibius (*Isohypsibius*) *papillifer* Marcus, 1936, p. 245, fig. 243

Os animais são pequenos e transparentes. Possuem pigmentos visuais pretos. A cutícula do corpo apresenta gibas com espinho, ora pequeno, ora grande, no polo. Daí o aspecto mamilar das gibas. Os meus espécimes teem 5pares de gibas laterais e um par dorsal na última faixa posterior. Mostram ainda 2 pares de papilas : um bucal e o outro localizado entre as 1.ª e 2.ª faixas transversais anteriores. Faringe oval com 3 macroplacóides iguais na forma (pequenos bastonetes) e no tamanho. As garras interna e externa diferem muito pouco de tamanho. Comprimento do corpo : até 250 μ.

Postura : 6 ovos, no máximo.

Brasil, Estado de S. Paulo : Campos de Jordão (Capivarí). Groenlândia, Spitzberg. Escócia, Alpes suiços até 1.800 m., Checoslováquia até 2.000 m. Austrália e Nova Zelândia.

Hypsibius (*Hypsibius*) *convergens* (Urbanovicz, 1866) (Figs. 6-8)

Hypsibius (*Hypsibius*) *convergens* Marcus, 1936, p. 266, fig. 257

Animais de tamanho pequeno, mas robustos. Observados à luz transmitida, apresentam cor acizentada. Pigmentos visuais pretos. A cutícula é lisa e incolor; nem mesmo se veem poros. Faixas cuticulares transversais bem nítidas. Tubo bucal relativamente fino e curto (27 μ × 2 μ) com os processos de inserção muscular em forma de ganchos. Estiletes fortes e pouco encurvados. Faringe oval (26 μ × 21 μ), com 2 macroplacóides : o 1.º (5 μ × 2 μ) em forma de bastonete e ligeiramente côncavo na parte externa; o 2.º (3 μ × 2 μ), tambem em bastonete e um pouco convexo. Existe microplacóide, porem, reduzidíssimo. A garra externa (16 μ), bem maior que a garra interna (9 μ), tem no ponto de articulação entre o ramo principal e o ramo secundário da pata IV, uma pequena peça até agora não descrita (fig. 8). Nota-se, ainda nesta pata, que o conhecido prolongamento da base das garras externa e interna se isola delas, de maneira a formar uma fita quitínica livre. Esta particularidade foi verificada nos meus dois exemplares. O ramo principal de ambas as garras, fino e comprido, mostra duas pontas accessórias em sua extremidade livre. Comprimento do corpo : 400 μ.

No presente material faltam ovos.

Brasil, Estado de São Paulo : cidade de São Paulo. América do Norte (Niagara). Norte, centro e leste da Europa. Ilhas sub-antárticas do Índico (Possession & Heard). A classificação do material de procedência ártica não está certa.

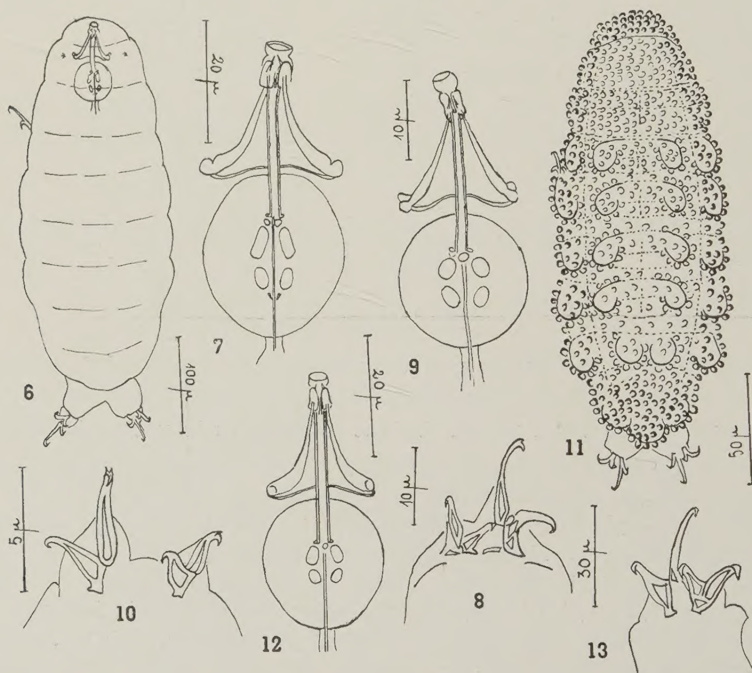
Embora *H. dujardini* (Doy., 1938) e *H. convergens* sejam espécies muito vizinhas (MARCUS, 1936, p. 268), principalmente depois de ter

encontrado Cuénot (1932, p. 72), às vezes, microplacóide em *H. pallidus* que, segundo Marcus não é *H. pallidus* Thullin (1911, p. 36) mas, sim, *H. convergens,* baseando-me na largura dos macroplacóides, nas pequenas dimensões do microplacóide e no feitio maciço dos atuais exemplares, classifico-os como *H. convergens.*

Hypsibius (Hypsibius) microps Thullin, 1928
(Figs. 9-10)

Hypsibius (Hypsibius) microps Marcus, 1936, p. 273, fig. 262

Espécie pequena e de corpo alongado, com o maior diâmetro entre as patas II e III. A fronte levanta-se perpendicularmente ao ventre. Pigmentos visuais



Hypsibius (Hypsibius) convergens (Urbanovicz) — Fig. 6: Vista dorsal; fig 7: faringe; fig. 8 : garras. *Hypsibius (Hypsibius) microps* Thulin — Fig. 9 : Faringe; fig. 10 : garras. *Hypsibius (Hypsibius) oberhaeuseri* (Doyère) — Fig. 11: Vista dorsal; fig. 12: faringe; fig. 13: garras.

escassos; faltam mesmo em espécimes da Hungria. Cutícula lisa e transparente. O tubo bucal, fino, inclina-se para o lado dorsal até a entrada na faringe, dirigindo-se daí para trás em linha reta. Processos de inserção muscular em forma de gancho. Faringe redonda com apófises grandes e 2 macroplacóides iguais e granuliformes. Em material húngaro, os macroplacóides são duas vezes e meia mais compridos que largos e ligeiramente curvos. Não há microplacóide. Garras relativamente grandes e de tamanho diferente. Existem duas pontas accessórias no ramo principal e a cutícula mostra-se mais delgada no centro dos dois ramos (principal e secundário). Comprimento do corpo: até 295 µ. Dimensões de um dos meus exemplares: aparelho bucal — 31 µ; largura do tubo bucal — 2 µ ou 11,70% do comprimento da faringe; faringe — 17 µ de comprimen-

to ou 127 por mil do comprimento do corpo, para 16 μ de largura ou 94 % do seu comprimento; 1.º e 2.º placóides — 2 μ ou 11,70 % do comprimento da faringe; garra posterior — 5 μ ou 37 por mil do comprimento do corpo (133 μ).

Ovos elipsóidicos com casca lisa. Postura até 4 ovos na cutícula velha.

Brasil, Estado de S. Paulo : Capivarí (Campos de Jordão). Suécia meridional, Chescolováquia - 1.613 m., Hungria. Sibéria (Montanhas do Altai).

Hypsibius (Hypsibius) oberhaeuseri (Doyère, 1840) (Figs. 11-13)

Hypsibius (Hypsibius) oberhaeuseri Marcus, 1936, p. 278, fig. 265

A espécie tem tamanho médio. Os animais adultos mostram 9 faixas transversais e 5 longitudinais acinzentadas, acastanhadas, castanho-avermelhadas, ou raramente, violetas, dando ao corpo um aspecto de xadrês. As cores violeta e púrpura aparecem, de preferência, com a dissolução dos pigmentos em animais muito velhos ou fixados. Nos jovens não se observa pigmentação. Cutícula, em geral, granulosa, com espessamentos em nódulos mais nítidos na região caudal. Há, tambem, exemplares quase lisos. Tubo bucal (19 μ de extensão no material presente) muito estreito. Processos de inserção muscular em forma de gancho. Na faringe, curta e oval (21 μ × 19 μ), encontram-se as apófises e 2 macroplacóides, dos quais o 1.º é oval e maior que o 2.º, quase redondo. Medem nos meus exemplares, respectivamente, 3 μ e 2 μ. Microplacóide ausente. Garras desiguais : a anterior (interna das patas I-III) compõe-se de ramos mais espessos e mais curtos; a garra posterior (externa das patas I-III) apresenta a parte basal maior que o ramo secundário. Este é bastante encurvado e o ramo principal, comprido e delgado à maneira de cerda, tem duas pontas accessórias na extremidade livre. Como carater sexual secundário, vê-se no lado externo da pata IV uma ponta aplanada, bem desenvolvida no macho, porem, pouco nítida na fêmea. Comprimento do corpo : até 450 μ; raramente, 500 μ.

Os ovos, pequenos e esféricos, medem 50 μ - 57 μ de diâmetro, sem saliências. Estas são irregulares : ora em forma de tronco de cone, ora em espinhos. Como no gênero *Macrobiotus*, a postura dos ovos é livre; só se faz, excepcionalmente, na velha cutícula.

Brasil, Estado de S. Paulo : Juquerí, Caieiras e Itatiáia. Bolívia — 4.000 m., Colômbia. Colúmbia Britânica. Europa setentrional, central e meridional. Himaláia (?). África oriental e meridional. Oceânia (Oaú). Ilhas antárticas.

Esta espécie, de distribuição cosmopolita, ainda não tinha sido bem verificada no Brasil, como indica a discussão da sinonímia (Marcus l.c., p. 281).

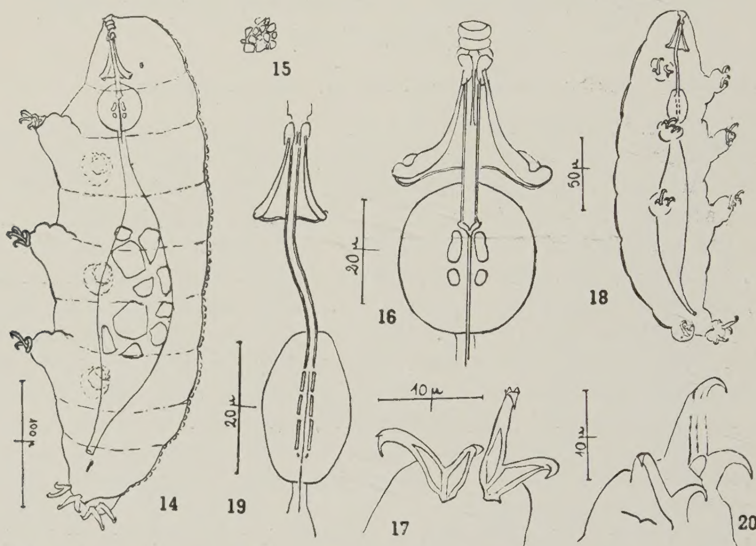
H. oberhaeuseri distingue-se de *H. novemcinctus* Marcus (1936, p. 281), pelos ovos e pelas faixas longitudinais não pigmentadas, ausentes na última espécie.

Hypsibius (Hypsibius) evelinae Marcus, 1928 (Figs. 14-17)

Hypsibius (Hypsibius) evelinae Marcus, 1936, p. 283, fig. 267

Animais de tamanho médio, até grande. A cor alaranjada ou amarelada do corpo é devida aos pigmentos contidos nas células de reserva. Pigmentos

visuais presentes. Na cutícula transparente do corpo (material do Itatiáia) observam-se verrugas, como em *H. oberhaeuseri*, porem, menos acentuadas. Somente nos espécimes europeus distinguem-se gibas formadas de botões (até 12) e distribuidas no lado dorsal das patas, logo acima das garras, principalmente, da pata IV. Da redução destes botões podem resultar gibas lisas (material da cidade de S. Paulo). Tubo bucal largo. Como nas espécies do gênero *Macrobiotus*, há um curto porta-bainhas na parte ventral, o que constitue uma



Hypsibius (*Hypsibius*) *evelinae* Marcus — Fig. 14 : Vista dorso-lateral; fig. 15 : estrutura da cutícula do corpo; fig. 16 : faringe; fig. 17 : garras. *Hypsibius* (*Diphascon*) *scoticus* (J. Murray) — Fig. 18 : Vista ventro-lateral; fig. 19 : faringe; fig. 20 : garras.

exceção entre as espécies do gênero *Hypsibius*. Faringe oval (37 µ × 25 µ) com dois macroplacóides em forma de bastonete. O primeiro macroplacóide tem mais ou menos o dobro do comprimento do segundo macroplacóide. Falta microplacóide. As garras são relativamente pequenas. Nota-se uma leve diferença no tamanho das duas garras de uma pata, as quais possuem duas pontas accessórias no ramo principal. A partir da base até a extremidade livre, o ramo principal mede 15 µ e o ramo secundário, 11 µ. Comprimento do corpo : até 500 µ.

Ovos elipsóidicos, tendo o maior diâmetro 60 µ - 70 µ. A sua cutícula é lisa. Postura até 16 ovos na cutícula velha.

Brasil, Estado de S. Paulo : cidade de São Paulo e Pico de Itatiáia. Europa : arredores de Berlim.

Esta espécie, embora provida de porta-bainhas, foi incluida no gênero *Hypsibius*, devido ao tipo de suas garras. O aparelho bucal separa *H. evelinae* de *H. oberhaeuseri* (Doy., 1940), cujos machos mostram ainda uma saliência chata no lado externo das patas IV. As garras de *H. evelinae* assemelham-se às de *H. dujardini* (Doy., 1838), onde, entretanto, se nota uma diferença bem acentuada entre as garras da mesma pata. Vistas de frente lembram as garras de *H. tuberculatus* (Plate, 1888) mas, de perfil, teem aspecto diferente.

Hypsibius (*Diphascon*) *scoticus* (J. Murr., 1905) (Figs. 18-20)

Hypsibius (*Diphascon*) *scoticus* Marcus, 1936, p. 303, fig. 285

Corpo delgado e de tamanho pequeno até médio, raramente grande. Faltam pigmentos visuais. Cutícula lisa. Abertura bucal estreita (2 μ de diâmetro interno). Tubo bucal fino e encurvado, sendo o trecho entre os porta-estiletes e a faringe tão longo quanto a própria faringe. Faringe oval; seu comprimento corresponde ao dobro da largura. Há três macroplacóides em forma de bastonete e de dimensões diferentes. Assim, os dois primeiros são iguais e o 3.º maior, como no único exemplar que observei, ou diferentes (1.º maior que o 2.º, ou vice-versa), cabendo sempre ao 3.º a maior dimensão. Microplacóide muito nítido. Garras fortes, desiguais, com ou sem pontas accessórias no ramo principal. Comprimento do corpo : até 460 μ. Geralmente os animais, mesmo adultos, são menores : 217 μ - 370 μ.

Postura de ovos na cutícula velha.

Brasil, Estado de S. Paulo : Eldorado (cidade de S. Paulo). Perú, Colômbia. Colúmbia Britânica. Região ártica. Europa setentrional e central. África do Sul. Ilhas Crozet, Austrália, Nova Zelândia, Hawaí, Ilhas Shetlande do Sul.

Gen. *Itaquascon* Barros, 1939

Itaquascon Barros, 1939, p. 106

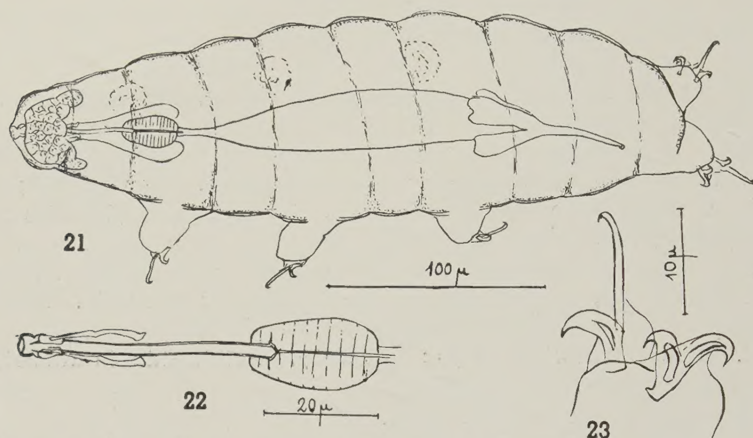
As garras são do tipo das dos *Hypsibius,* principalmente dos subgêneros *Hypsibius* (*sensu strictu*) e *Diphascon,* em que a garra externa possue os elementos basal e terminal separados, aparecendo o ramo secundário regularmente curvo em continuação à parte basal (Marcus, 1936, p. 223, 3.º tipo, fig. 230). Tubo bucal estreito e comprido, como no subgênero *Diphascon.* Processos de inserção muscular em forma de gancho. Os estiletes, delgados, apresentam-se em 2 arcos sucessivos. Faringe sem placóides, apenas revestida por cutícula fina. O gânglio faringeano superior corresponde ao da fam. *Macrobiotidae.* O número e a ordem das células da faringe concordam, tambem, com o das células faringeanas desta família.

Itaquascon umbellinae Barros, 1939 (Figs. 21-23)

Itaquascon umbellinae Barros, 1939 *a,* p. 103, figs 1, 2 e 3

Tamanho pequeno, até médio; muito esbelto. Cabeça estreita; o máximo da largura do animal está ao nivel da pata III. A cor do corpo, verde-acastanhada, é devida ao conteudo das células de reserva. Não possue pigmentos visuais. Cutícula lisa. Estiletes fracos, em duas curvaturas sucessivas. Tubo bucal fino com 2 μ (9 % do comprimento da faringe) de diâmetro interno. Os processos de inserção muscular teem forma de gancho. Faringe oval, quase duas vezes mais comprida que larga : 22 μ × 14 μ (largura : 63,63 % do comprimento). Faltam apófises, macro e microplacóides. Uma membrana cuticular reveste a faringe internamente. As glândulas salivares, compridas, extendem-se até às proximidades do bordo caudal da faringe. As patas são curtas e pos-

suem garras do tipo das de *Hypsibius* (*sensu strictu*) e *Diphascon*. Estas são muito diferentes uma da outra, tanto no tamanho, como na forma. O ramo



Itaquascon umbellinae Barros — Fig. 21: Vista dorsal; fig. 22; faringe; fig. 23: garras

principal articula-se pela sua base com o ramo secundário, por meio de um nódulo. Garra externa : 15 μ ou 48 por mil do comprimento do corpo; garra interna : 8 μ. Índice do comprimento das garras da pata IV — 1. 1,875. Comprimento do corpo (de quatro exemplares) : 266 μ - 312 μ.

Não foram encontrados ovos.

Brasil, Estado de S. Paulo : Itaquaquecetuba.

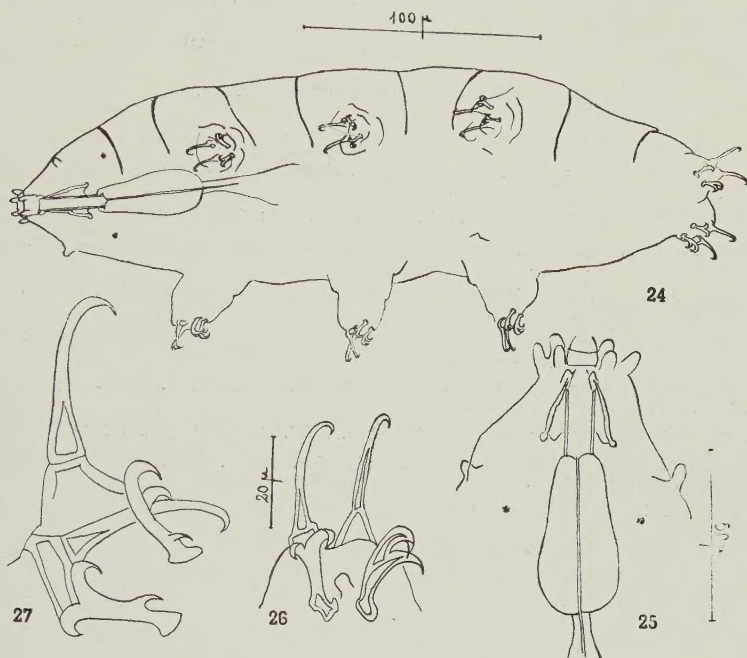
A ausência de placóides e a estrutura dos estiletes são comuns tanto ao gên. *Milnesium* Doy., 1840 como ao gên. *Itaquascon*. Entretanto, os dois gêneros de tal modo ficam afastados devido às garras, que foram incluidos em famílias diferentes. O mesmo em relação ao gênero *Hypsibius* Doy., 1840, cujas espécies possuem placóides na faringe.

Milnesium tardigradum Doyère, 1840
(Figs. 24-27)

Milnesium tardigradum Marcus 1936, p. 321, fig. 302

Corpo alongado, mais ou menos em forma de peixe; partes rostral e caudal estreitas. Incolores ou rosados, estes animais, quando velhos, possuem pigmentos amarelados e até acastanhados nas células da epiderme. Olhos pretos. Cutícula lisa com dobras anelares na região dorsal. Em um dos meus espécimes foram observadas, com imersão, pontuações cuticulares finíssimas e muito densas. A abertura da boca tem posição terminal. Seis papilas pequenas distribuem-se simetricamente, ao seu redor. As três papilas dorsais, do mesmo tamanho, são maiores que as três ventrais, tambem, iguais. Seis subdivisões da válvula bucal alternam-se com as papilas rostrais. Existem ainda duas papilas com disposição caudal e lateral. Tubo bucal muito largo e curto. Estiletes pequenos, delgados e encurvados em forma de *S*. Porta-estiletes de facil flexibilidade. Faringe comprida, piriforme, com a parte anterior mais estreita que a

posterior. Não há placóides. Os três primeiros pares de patas são maiores que o 4.º par. Nas duas garras de cada pata o ramo principal é completamente separado do ramo secundário. Este ramo (secundário) tem um número variavel



Milnesium tardigradum Doyère — Fig. 24 : dorso-lateral; fig. 25 : aparelho bucal; figs. 26 e 27 : garras.

de pontas accessórias (2-4). As garras de meus exemplares mostram zonas centrais de cutícula mais fina. Tal carater ainda não foi assinalado no material enropeu. Comprimento do corpo : 500 μ - 1205 μ.

Ovos elipsóidicos ou esféricos, de casca lisa, rosados ou ligeiramente acastanhados. Dimensões : 70 μ até 133 μ. Postura no máximo 18 ovos, dentro da cutícula velha.

Brasil, Estado de S. Paulo : várias localidades. América do Sul : Brasil, Paraguai, Chile, Terra do Fogo e Ilhas Falkland, Perú (4.300 m.), Colômbia. América do Norte : Colúmbia Britânica e Canadá. Groenlândia e outros paises árticos. Europa : norte, centro e sul. Ásia : Himaláia (6.600 m.) e ilhas maláias. África : Canárias, sul e sudoeste do continente. Ilhas do Índico meridional (Kerguelen, etc.). Austrália, Nova Zelândia e Polinésia (Oaú). Geórgia do Sul e região ocidental antártica .

BIBLIOGRAFIA

BARROS, R. de, 1938, Macrobiotus evelinae nova especie dos Tardigrados, *Bol. Biol., S. Paulo,* n. s., 3(2) : 52-54.

BARROS, R. de, 1939, Pseudechiniscus juanitae, nova espécie de Tardigrado. *Bol. Biol., S. Paulo,* n. s. 4(3) : 367-368.

BARROS, R. de, 1939 a., Itaquascon umbellinae gen. nov. spec. nov. (Tardigrada, Macrobiotidae). *Zool. Anz.,* 128(3-4) : 106-109.

CUÉNOT, L., 1932, *Tardigrades,* Faune de France, 24: 1-96, figs. 1-98, *Paris.*

MARCUS, E., 1928, *Bàärtierchen (Tardigrada).* F. Dahl, Tierwelt Deutschlands, 12: VIII + 230 pp., 265 figs. *Jena.*

MARCUS, E., 1928, *Tardigrada.* Bronn's Klassen & Ordnungen des Tier-Reichs. 5(4): VI + 608 pp., 398 figs. t. 1. *Leipzig.*

MARCUS, E., 1936, *Tardigrada.* Das Tierreich (Preuss. Akademie Wissensch.), 66: XVI + 340 pp., 306 figs. *Berlin & Leipzig.*

MARCUS, E., 1939, *Tardigrada.* The Percy Sladen Trust Exped. to Lake Titicaca. *Trans. Linn. Soc.*, ser. 3, 1(1): 45-49.

MIHELCIC, F., 1938, Beiträge zur Kenntnis der Tardigraden Jugoslawiens IV. *Zool. Anz.*, 123 (10-12): 316-318.

MURRAY, J., 1907, Scottish Tardigrada, collected by the Lake Survey. *Trans. R. Soc. Edinb.*, 45(3): 641-663, pls. 1-4.

MURRAY, J., 1907, Some South African Tardigrada, *J. R. Micr. Soc.*, 1907, pp. 515-524, pls. 17-18.

MURRAY, J., 1910, Tardigrada, *Rep. Sci. Inv. Brit. Antarct. Exp.* 1907-1909 (E. H. Shackleton) 1(5): 81-195, pls. 14-21. *London.*

MURRAY, J., 1913, African Tardigrada. *J. R. micr. Soc.* (2): 136-144, pls. 6-7.

NEDERSTRÖM, P., 1919, Die bis jetzt aus Finnland bekannten Tardigraden. *Act. Soc. Faun. Flor. Fenn.* 46(8): 1-25.

RAHM, G., 1929, Alte und neue Versuche zur Lösung der Frage, etc. *Xe. Congr. Int. Zool.*, (Budapest), 1927, 1: 261-271.

RAHM, G., 1932, Freilebende Nematoden, Rotatorien und Tardigraden aus Südamerika, etc. *Zool. Anz.*, 98 (3-4): 94-112; (5-6): 113-128.

RICHTERS, F., 1908, Die Fauna der Moosrasen des Gaussberges, etc. *D. Sudp. Exped.*, 1907 (Zool. v. 1), 9 (4): 259-302, t. 16-20.

RICHTERS, F., 1911, Südamerikanische Tardigraden. *Zool. Anz.*, 38, t. 273-277.

RICHTERS, F., 1911 a, *Faune des Mousses, Tardigrades.* Camp. Arct. Duc d'Orleans, 1907, pp. 1-20, pls. 1-2. *Bruxelles.*

THULIN, G., 1911, Beiträge zur Kenntnis der Tardigradenfauna Schwedens. *Ark. Zool.*, 7(16): 1-60.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 11-28
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

NOTES ON TRICHODECTIDAE (MALLOPHAGA) [1]

G. H. E. HOPKINS, M. A.

Kampala, Uganda

(With 21 figures)

Figures 1-9 in this paper are the work of my friend Mrs. G. J. Edney, to whom I wish to express my gratitude. For the remaining figures I am deeply indebted to my friend Dr. F. L. Werneck, who spontaneously offered to make the drawings and also undertook the wearisome task of reading the proofs for me.

The types of all the species described below will be presented to the British Museum as soon as conditions allow.

THE GENERIC POSITION OF THE MALLOPHAGA OF THE ANTELOPES

All hollow-horned ruminants which have been sufficiently examined have been found to possess one species of *Trichodectidae*, and the domestic goat is the sole known instance in this group of mammals of a host which possesses more than one species of *Trichodectidae*. The genera into which the forms found on antelopes have been divided include *Damalinia* Mjöberg, 1910; *Bovicola* Ewing, 1929; *Tricholipeurus* Bedford, 1929; and *Holakartikos* Kéler, 1938. The genotypes of *Damalinia* and *Tricholipeurus* are from antelopes, those of *Bovicola*, and *Holakartikos* from the domestic goat.

Using Bedford's principle (mentioned in my last paper published in this journal) to examine the *Trichodectidae* of the antelopes, it soon becomes obvious that there is something seriously wrong with our present generic concepts. I give below a list of the antelopes from which *Trichodectidae* are known, with the genus in which each parasite would be included if we use the current classification. The hosts are arranged according to their subfamilies, and I have added (for a reason which will become apparent below) the approximate height of the host at the shoulder. The subspecies of the hosts are omitted.

[1] Received for publication December 7, 1942.
Published by permission of the Director of Medical Services, Uganda.

HOST	*SUBFAMILY*	*HEIGHT*	*PARASITE*
Alcelaphus lelwel	*Alcelaphinae*	52"	*Bovicola*
Damaliscus albifrons	"	40-42"	*Damalinia*
Connochaetes gnou	"	46"	*Bovicola*
Gorgon taurinus	"	51-52"	*Damalinia*
Cephalophus caerulus	*Cephalophinae*	13"	*Tricholipeurus*
Cephalophus nigrifrons	"	18-19"	*Tricholipeurus*
Sylviacapra grimmi	"	23-25"	*Tricholipeurus*
Oreotragus oreotragus	*Oreotraginae*	20-22"	?
Neotragus pygmaeus	*Neotraginae*	10"	*Tricholipeurus*
Ourebia ourebi	"	24-26"	*Tricholipeurus*
Raphicerus campestris	"	22"	*Tricholipeurus*
Rhynchotragus guentheri	*Madoquinae*	14"	*Tricholipeurus*
Adenota kob	*Reduncinae*	32-35"	*Bovicola*
Kobus ellipsiprymnus	"	48-53"	*Bovicola*
Onotragus leche	"	40-41"	*Bovicola*
Pelea capreolus	"	30-31"	*Bovicola*
Redunca arundinum	"	36-37"	*Tricholipeurus*
Redunca fulvorufula	"	28-31"	*Tricholipeurus*
Aepyceros melampus	*Aepycerotinae*	37-38"	*Tricholipeurus*
Aepyceros petersi	"	38"	*Tricholipeurus*
Antidorcas marsupialis	*Antilopinae*	30-32"	*Tricholipeurus*
Antilope cervicapra	"	32"	*Tricholipeurus*
Gazella dorcas	"	21-24"	*Tricholipeurus*
Gazella granti	"	32-34"	*Tricholipeurus*
Gazella thomsonii	"	25-27"	*Tricholipeurus*
Taurotragus oryx	*Tragelaphinae*	67-70"	*Damalinia*
Tragelaphus scriptus	"	28-30"	*Tricholipeurus*

It is quite clear from the above list that there is no good correlation between subfamily of host and genus of parasite. At first sight there does appear to be a very imperfect correlation of this nature (the *Antilopinae,* for instance, possessing only *Tricholipeurus*), but further examination immediately shows that a subfamily of hosts is infested with only one genus of parasites when the subfamily shows no great range in size. and not otherwise. There is a most striking (though not quite perfect) correlation between size of host and genus of parasites : with the sole exception of *Bovicola pelea Bedford*, from *Pelea capreolus,* the species referred to *Damalinia* and *Bovicola* are all from hosts of large size and the parasites referred to *Tricholipeurus* are all from much smaller animals. [2]

The single discrepancy is probably due to the true correlation being with texture of coat rather than with size — a coarse coat usually, though not invariably, going with large size; unfortunately I do not

[2] An exactly parallel phenomenon occurs in the *Trichodectidae* of deer, where the species referred to *Rhabdopedilon* are found on the larger hosts and those referred to *Cervicola* on the smaller hosts. I am convinced that the former genus must be sunk as a synonym of *Cervicola,* which was described four years earlier.

know the type of coat possessed by *Pelea,* and the only available book on Africa antelopes merely describes it as "somewhat woolly". Omitting the case of *Pelea,* this correlation is particularly striking in *Reduncinae* and *Tragelaphinae*; it may be apparent to some degree even within a host-genus, for the parasite of *Gazella granti,* for instance, is much stouter than the species found on smaller species of *Gazella,* approaching *Bovicola* to some degree in this character. The parasite of *Oreotragus* (which is small but has an exceptionally coarse coat) combines the head-form of *Bovicola* with a general facies intermediate between *Bovicola* and *Tricholipeurus.*

Let us now consider the characters on which the antelope-infesting species of *Trichodectidae* were divided into genera. Kéler (1938, p. 459) defines his family *Bovicolidae* as : Elongate, oval or barrel-shaped species, usually with head densely beset with setae, an oblique transverse row of setae on each side on the protergum, and a dense transverse row of very short setae on the abdominal segments. Thumbs with hyaline apical spurs. The following is a rearrangement of his key to the genera of *Bovicolidae,* omitting those genera to which no antelope-infesting species have been referred :

1. Preantennal region long trapezoidal with deep V shaped osculum .... *Damalinia.*
— Preantennal region otherwise shaped, if trapezoidal then with flat osculum .... 2.
2. Preantennal region distinctly trapezoidal with flat, roundish, or triangular osculum. Head weakly transverse or elongate, with a postepistomalis seta and a transverse row of vertical setae .... *Tricholipeurus.*
— Preantennal region crescentic or semicircular, sometimes truncate anteriorly or flatly emarginate .... 3.
3. Chaetotaxy of body short and thin, middle part of head and postvertex naked. Abdominal segments dorsally with 1-2 rows of short setae. Legs and antennae with thin setae or with only sparse thick spines among them. Penis without endomeres .... *Bovicola.*
— Chaetotaxy of body spiny and very dense. Head only naked at postvertex. Abdominal segments beset with a row of longer, and anterior to these a row of shorter setae. Penis with endomeres .... *Holakartikos.*

Holakartikos can soon be dismissed, because Kéler referred only one of the Mallophaga of antelopes to this genus, and I am quite unable to understand why he did so. The species in question is *Trichodectes harrisoni* Cummings; its chaetotaxy is utterly unlike that of the genotype of *Holakartikos* and agrees with Keler's own definition of that of *Bovicola.* The genitalia admittedly include endomeres, but the degree of reliance to be placed on this character may be judged from the fact that Kéler only included three species in the genus, of which one is not known in the male sex, so that he was generalising from only

two species. Furthermore, the statement that endomeres are absent in *Bovicola* is not correct; they are present in the genotype and in many other species, though they have often been mistaken for the parameres, which are frequently much reduced or modified in this group. *Trichodectes harrisoni,* though a rather unusual species, is not generically separable from other species, found on antelopes, which have been referred to *Bovicola.*

This leaves *Bovicola, Damalinia* and *Tricholipeurus* to be discussed. In KÉLER's key *Damalinia* is separated from all the other genera found on ruminants by the shape of the frons, and he gives no other differentiating character. He separates *Tricholipeurus* from all the remaining genera by the shape and chaetotaxy of the head. Actually the chaetotaxy of the head is precisely the same in many members of all three groups : on the central field of the dorsum of the head there is an anterior row of postepistomal setae and a posterior row of vertical setae; normally both these rows ar single, but in *T. harrisoni* the setae are more numerous and the anterior row is irregular and tends to be multiple; in *ovis,* for example, the setae are still more numerous and the groups of setae tend to merge with one another.

Frontolateral setae may be numerous, few, or absent in species which must be referred to *Tricholipeurus* if the genus is to be maintained. Certainly the chaetotaxy of the head will not assist us in dividing into genera the species contained in these three groups. The chaetotaxy of the thorax and abdomen is even more uniform : on the dorsal surface of the thorax there are a prothoracic row (often reduced to one seta on each side), a mesothoracic row, and a metathoracic row, both the latter single and consisting of numerous setae; on the dorsum of each unmodified abdominal segment there is a very regular single row of small tergocentral setae and very occasionally indications of a second somewhat irregular row anterior to it, a group of tergolateral setae and a group of pleural setae, the tergolateral group often appearing as a continuation of the tergocentral row and easiest distinguished by its irregularity. A character to which KÉLER attaches great importance is the structure of the apical portion of the tibia : I can find no difference in this respect between typical species of *Damalinia, Tricholipeurus* and *Bovicola.*

The presence or absence of more than one tergal plate on one of the abdominal segments in the male is also certainly of no generic importance; the extra plates are present in *Tricholipeurus reduncae, T. trabeculae* and *T. clayi* and absent in all other species of this group, yet in other respects these are typical members of *Tricholipeurus;* in *Damalinia* they are always present, and in *Bovicola* they are present in most species but decidedly variable in number. The male genitalia are

very variable in the *Trichodectidae* of *Bovidae,* and some authors attach generic importance to the structure of these organs, but in view of the very great differences in the male genitalia of obviously very closely-related species (*Tricholipeurus aepyceros, T. elongatus* and *T. lineatus,* for instance) I cannot regard them as having more than specific value.

We are left with only the general facies of the insect, and in particular the shape of the head, to distinguish *Damalinia, Tricholipeurus* and *Bovicola* from each other, and here also we find that no sharp distinction can be drawn. The most extreme members of each group are very distint in facies and in head-shape, but there are numerous intermediates. I have already (1941, p. 41) expressed misgivings as to whether *Bovicola chorleyi* and its allies should be separated from *Damalinia,* and further study of the group has not only convinced me that it should not, but also that *Tricholipeurus* and *Bovicola* cannot be kept separate from *Damalinia.* The differences between extreme members of *Damalinia* and *Bovicola* (*D. crenelata* and *B. hilli,* for example) are very striking, yet if we consider the group as a whole these differences completely disappear. In *crenelata* the frontal concavity is very deep and narrow, in *theileri* it is much shallower and broader, in *hopkinsi* narrow but very shallow, in *chorleyi* and its relatives broad but extremely shallow, in *conectens* (described below) the frons is convex. In general facies the members of this series pass imperceptibly from rather elongate insects with sub-parallel abdominal margins to stouter forms with markedly convex margins. When we come to *Tricholipeurus* the case is even stronger : it is completely impossible to draw a line which would separate species with a narrow and deep frontal concavity, such as *T. lerouxi,* from those with a shallow and broad concavity, such as *T. antidorcus,* nor can we find any division between comparatively stout species with convex sides (*T. reduncae*) and very elongate forms with sub-parallel sides (*T. lineatus*); in both characters there is a complete transition between the two extremes. The final fact which convinced me that *Tricholipeurus* cannot be kept separate was the discovery of *Damalinia annectens,* described below. In size and general appearance this species is a typical *Tricholipeurus,* in head-shape and the form of the male genitalia (for those who consider the latter of more than specific value) it is a *Damalinia.*

Damalinia conectens is an even more perfectly transitional form between *Tricholipeurus* and *Bovicola.* Its head, both in shape and chaetotaxy, resembles that of such a species of *Bovicola* as B. ovis, its abdomen is also intermediate in shape between the type found in *ovis* and that found in extreme forms of *Tricholipeurus,* while its genitalia are of the type found in such extreme forms of *Tricholipeurus* as *victoriae.* The only alternative to uniting *Tricholipeurus* and *Bovicola*

would be to erect a new genus for *conectens* and I am convinced that this course would be thoroughly unjustified.

I consider, therefore, that *Tricholipeurus* and *Bovicola* cannot be separated from *Damalinia,* and I refer to the latter genus all the species hitherto referred to *Tricholipeurus,* together with *Bovicola adenota* Bedford, *B. bovis* (Linn.), *B. caprae* (Gurlt), *B. chorleyi* Hopkins, *B. dimorpha* Bedford, *Trichodectes harrisoni* Cummings, *Bovicola hilli* Bedford, *B. limbatus* (Gervais), *B. martinaglia* Bedf., *B. ovis* (Schrank) and *B. pelea* Bedf., as well as the three species at present included in *Damalinia.* As I have not yet examined minutely the characters of the other genera included in the *Bovicolinae,* I cannot express any opinion as to their validity.

With regard to the family *Trichodectidae* in general, I am convinced that evolution has again and again taken parallel lines in different groups, so that extreme care is necessary if we are not to be misled into mistaking instances of convergence for cases of true relationship. This is certainly very often true of the loss of spiracles and of the possession by two insects of male genitalia of a similar type. A remark (Ellermann, 1940, p. 22) which was written of the Rodents should be remembered whenever the genera of the *Trichodectidae* are under consideration : "The most important point to be emphasized is that 'Parallelism, parallelism, more parallelism and still more parallelism' is the evolutionary motto of the Rodents in general". This might equally well have been written of the *Trichodectidae.*

FIVE NEW SPECIES OF TRICHODECTIDAE FROM ANTELOPES

In the descriptions which follow I have introduced a few new or little used terms which should give greater precision to the descriptions. Cervical index and abdominal index have both been used before but deserve a more general application. Cervical index has been defined by Clay (1940, p. 2) as "breadth : length, taken from centre of clypeal margin to centre of occipital margin", but the peculiar head-shape of such species as *Damalinia crenelata* in the group under discussion, or of the genera *Acidoproctus* and *Ornithobius* among bird-infesting Mallophaga, makes this definition unworkable in such instances; I define it as the maximum length of the head divided by its maximum breadth at the temples. Abdominal index is the length of the abdomen divided by its maximum breadth, and total index is the total length of the insect divided by the maximum breadth of the abdomen. In both cases the structures projecting from the apex of the abdomen in the males of such species as *Damalinia chorleyi* (Hopkins) and *D. crenelata* (Piaget) are included in the legth, but not the male genitalia, which often

project somewhat beyond the apex of the abdomen even when they are retracted.

The frontal angle is the angle formed by the emargination (present in most species of *Damalinia*) of the frons with the long axis of the head. This angle varies very little within a species and it is one of the most useful specific criteria, but its measurement presents some difficulty when the angle approaches 90° (*i. e.* in species with an almost flat frons), when the sides of the frontal concavity are convex, and when the concavity has a square or rounded apex (as in *D. crenelata*). In the case of species (*elongatus*, for example) in which the concavity has clearly-marked ends but concave sides, the angle is measured from an imaginary straight line joining the ends, and in those whose frontal concavities have square or rounded apices (*e. g. annectens*) the sides are considered as being produced until they meet.

Although I do not regard the general facies of the insect as being of even subgeneric value within *Damalinia*, yet it is an extremely convenient character in describing and recognising the species. I propose to write of Damalinioid, Tricholipeuroid and Bovicoloid forms, though regarding the groups which are defined by these terms as having an adaptive and not a phylogenetic significance.

In the cases of all the species described below I have recorded the numbers of each sex which were found, but counting the nymphs was found to take up too much time and had to be abandoned. The proportion of nymphs probably varies considerably from time to time within a species, but seems to be normally of the order of two nymphs per adult (*annectens* 316:112, *conectens* 124:103, *spinifer* 751:348, *victoriae* 911:590). In all these species females are slightly more numerous in the collections than males.

Damalinia victoriae n. sp.
(Figs. 1-4)

A small, moderately sclerotised, very elongate Tricholipeuroid species, so like *Damalinia lineata* (Bedford) that only the differences need be noted.

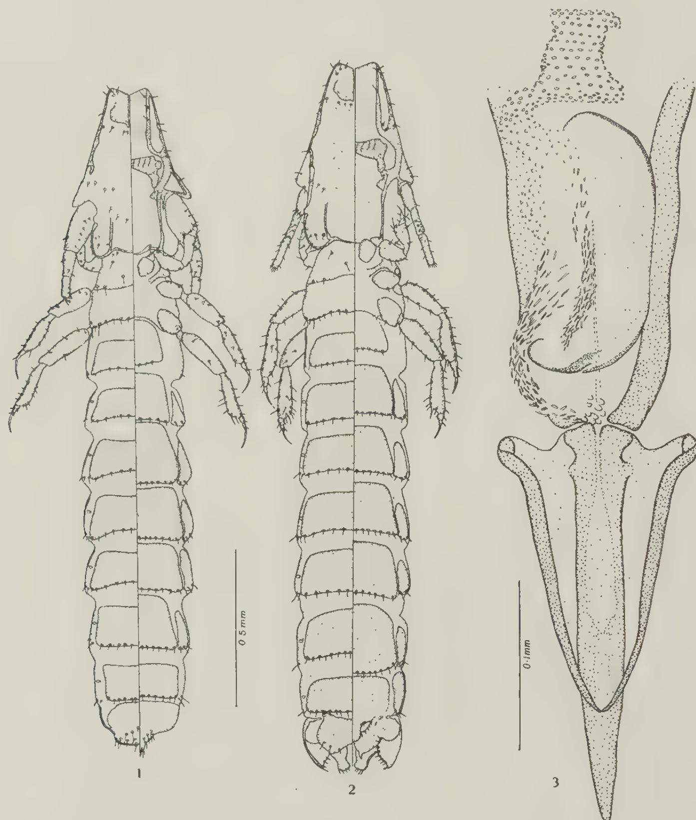
Male (fig. 1) — Lenght 2.08 mm. Frontal angle about 75°. Total index 6.05. Head much longer and narrower than that of *lineata* (index 2.03); frontal notch distinctly deeper and with straighter sides; temples projecting beyond vertex to a slightly greater degree; antenna longer and slenderer. Chaetotaxy of head indistinguishable from that of *lineata*.

Prothoracic tergocentral seta very much larger than the others, or than in *lineata*.

Abdominal index 3.85. Apex of last abdominal tergite even straighter than in *lineata*, bearing rather fewer setae, and these setae distinctly shorter. Apex of last abdominal sternite stouter and ending more squarely.

Genitalia (fig. 3) very like those of *lineata*, the parameres fused to form a very perfect V (whence the specific name), but longer and slenderer than in

lineata and distinctly curved instead of practically straight. Endomeral rod tapering regularly to its apex (without the swelling found in *lineata*) and showing distinct traces of its derivation from a pair of fused endomeres. Basal plate with much smaller median linear sclerite. Copulatory sac armed with coarser



Damalinia victoriae n. sp. — Fig. 1: Male; fig. 2: female; fig. 3: male genitalia.

denticles, and its apex strongly sclerotised (not, or very weakly, sclerotised in *lineata*).

Female (fig. 2) — Length 2.24 mm. Total index 6.10.

Head appearing even slenderer than in male but not actually so (index 1.90). Abdominal index 3.80. Tergal plate of eighth segment with a very large triangular emargination of the posterior border (fig. 2). Anterior end of inner margin of swollen apical portion of gonapophyses somewhat more produced than in *lineata*, and the fringing setae of the gonapophyses shorter (fig. 4).

Type-material — Holotype male, allotype female and 175 male and 299 female paratypes from *Rhynchotragus guentheri smithi* (Thomas) (Western Guenther's dik-dik), Nyanga, Jie County, Karamoja, Uganda, 9.ix.1941, T. W. Chorley.

The entire type-series, together with 788 nymphs, was obtained by dissolving the hair of three individuals, all of which were infested, so the species would seem to be very common. I also have a series of 37 males, 79 females and 123 nymphs obtained by dissolving the hair of two specimens of *Rhynchotragus kirkii cavendishi* (Thomas), obtained near Naivasha, Kenya Colony. These are

absolutely inseparable from the type-series, but I have refrained from making them paratypes on account of the supposed specific difference between the hosts.

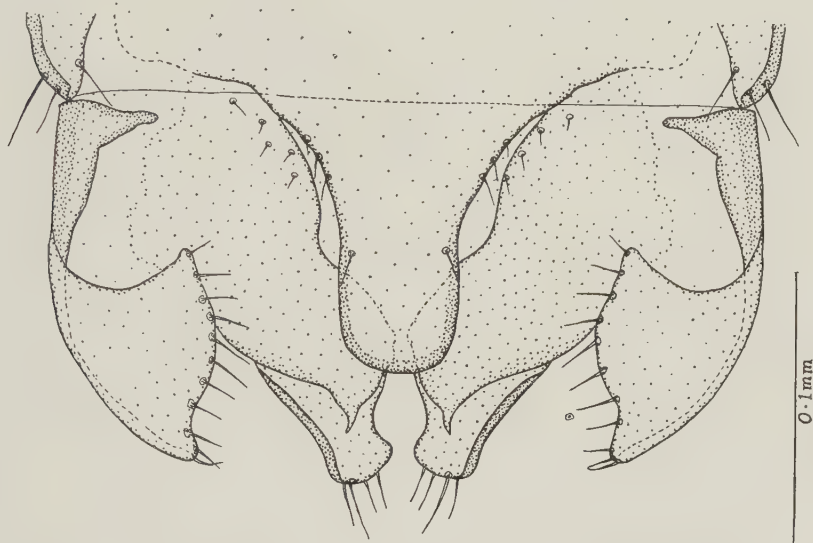


Fig. 4 — *Damalinia victoriae* n. sp., genital region of female

Damalinia ourebiae n. sp.
(Figs. 5-9)

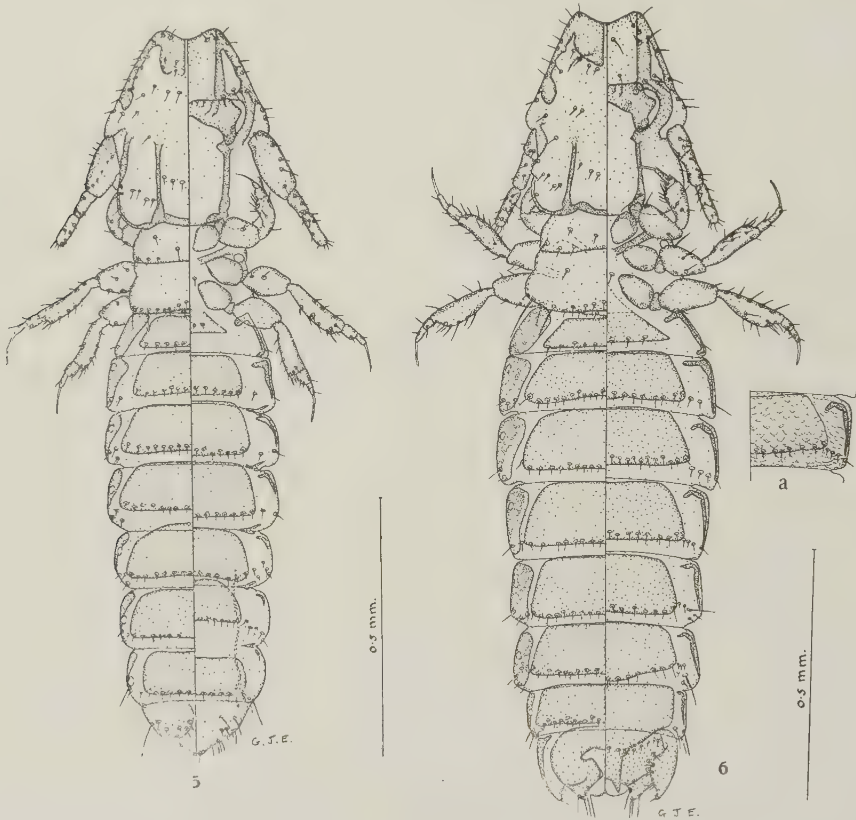
A small, rather stout Tricholipeuroid species, which is not very closely related to any hitherto described; possibly nearest to *D. antidorcus* (Bedford), but easily distinguishable from this and all other known species by the shape of the head and the characters of the male and female terminalia. Colour dark, the tergal and sternal plates being extensive and dark brown.

Male (fig. 5) — Length 1.43 mm. Frontal angle about 63°. Total index 4.17.

Head rather large in proportion and fairly broad (index 1.35); frontal notch shallow and very like that of *D. parkeri* (Hopkins); preantennal region with practically straight, slightly convergent sides; temples projecting only slightly posteriorly beyond the vertex; trabeculoid processes very weakly sclerotised, broad and with rounded apex. First segment of antenna very much enlarged, but not so much as in many species of the genus, comprising only just over half the length of the antenna and about twice the diameter of the second segment, second and third segments subequal in diameter but the third about 1 ½ times the length of the second. Chaetotaxy of head almost exactly as in *parkeri.*

Prothorax much broader than long, with convex outer margin and a very large spiracle, its chaetotaxy as in *parkeri* except that I can find no trace of a seta in the anterolateral angle, the tergocentral seta is hardly larger than the others and the row of setae near the hind margin usually contains only three setae on each side. Pterothorax very little broader and a little longer than prothorax, the meso-metathoracic junction clearly indicated; of the setae on the posterior margin a few (in the holotype the outermost and third on one side and the two outermost on the other) are more than twice as long as the rest.

Legs without any characters of particular interest, proportionately distinctly larger than in *parkeri*, second and third pairs almost alike.



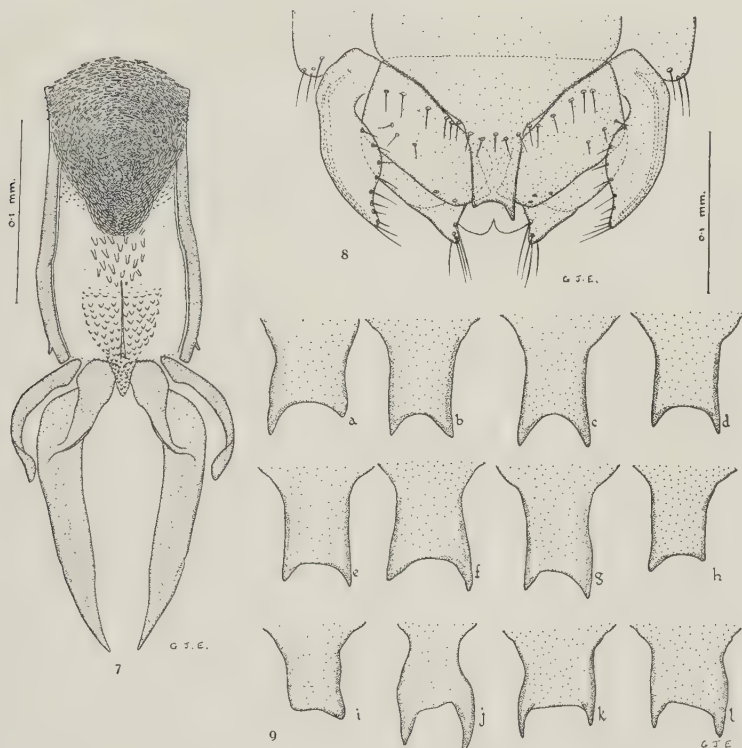
Damalinia ourebiae n. sp. — Fig. 5: Male; fig. 6: female (*a* — abdominal scale-like structure).

Abdomen with index 2.55, with moderately crenulated, almost parallel sides, second, third and fourth segments of almost equal width. Tergal and sternal plates large, rather well sclerotised, single. The usual small Y-shaped sclerites strengthening the ends of the intersegmental grooves (hereafter called the intersegmental sclerites) are present but are poorly sclerotised and very inconspicuous. The usual longitudinal sclerotic bars on each side of the genitalia are present and without special features; these bars are apparently the anchorage for the muscles which move the genitalia, and I propose for them the name "genital apodemes". Their presence or apparent absence seems to be of only minor taxonomic importance. Spiracles rather large in proportion to the size of the insect, present on apparent abdominal segments 2 to 7.

The whole surface of the head and body is covered with scale-like structures as shown in fig. 6a. These structures are frequent in the Trichodectidae and seem to be almost universal in *Damalinia*, but their shape and arrangement vary somewhat in different species.

Genitalia (fig. 7) with basal plate moderately long and slender, its sides concave anteriorly and convex posteriorly. Parameres short and strongly curved but with widely separated tips. Endomeres long and only very slightly curved, shaped like the blade of a sharp-pointed knife, poorly-sclerotised except basal-

ly; near the base there is apparently a broad flange on the outer side of the dorsal aspect and the endomere is much broader dorsally than ventrally. There is a very distinct, almost linear, median longitudinal sclerite on the apical portion of the basal plate. The copulatory sac is armed with small spines and plaques as in *parkeri* and has a somewhat similar sclerotised apex with "fingerpoint" striae, but the dagger-shaped sclerite is replaced by a pair of oval plates.



Damalinia ourebiae n. sp. — Fig. 7: Male genitalia; fig. 8: genital region of female; fig. 9: subgenital plates.

Female (fig. 6) — Length 1.46 mm. Total index 3.78 (the specimen drawn has the anterior abdominal segments slightly crushed and broader than is normal).

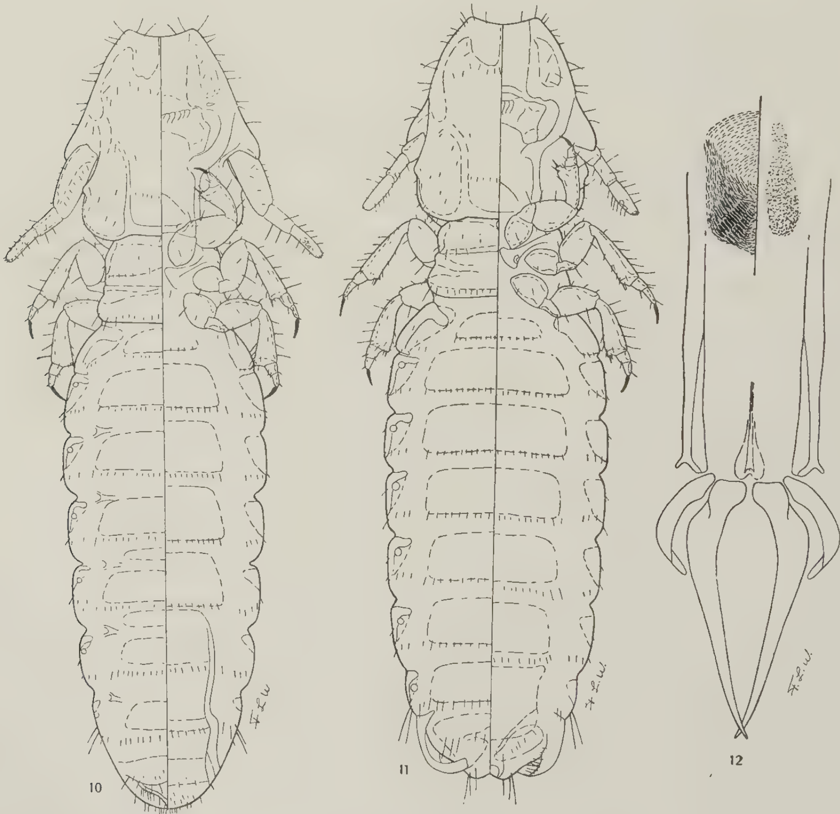
Cervical index 1.35, shape of head hardly differing from that of the male except for the unmodified antenna and consequent difference in the shape of the antennal fossa. Antenna with first segment slightly shorter and stouter than the second, the third segment the longest.

Thorax and legs as in male.

Abdomen distinctly stouter than that of the male (index 2.36) but otherwise similar except in the apical region and in the absence (as always) of the small Y-shaped sclerites and genital apodemes. Tergal plate of terminal segment (fig. 6) with a slot not unlike that of *parkeri* but differently shaped. Terminal portion of subgenital plate without apical setae, very variable, normally with almost straight and subparallel sides and the apex deeply concave and forming two spinose lateral projections, but very often strongly asymme-

trical. The terminal part of the subgenital plate of the allotype is shown in fig. 8, and those of all the first twelve other females in the type-series to be collected in fig. 9, where *a* is the plate of a specimen from the same host-individual as the types, *b-g* those from another host-individual from the type-locality, *h* and *i* from the Gulu host, and *j-l* from the host-individual obtained in Mongalla.

Gonapophyses (fig. 8) not like those of any adequately-figured species of the genus, their inner margin only rather gently convex, rather as in *parkeri*, but without the large and deep emargination which separates triangular projections in that species.



Damalinia spinifer n. sp. — Fig. 10: Male; fig. 11: female; fig. 12: male genitalia.

Type-material — Holotype male, allotype female, one male and one female paratypes from *Ourebia ourebi ugandae* De Beaux (Uganda common oribi), Nakitoma, Buruli, Buganda Province, Uganda, 12.v.1941, G. H. E. HOPKINS. Other paratypes from the same host-form as follows : — 4 males and 6 females, Nakitoma, May 1941, T. W. CHORLEY; 3 females, Gulu District, Uganda, May 1941, T. W. CHORLEY; 1 male and 3 females (the male and two females badly damaged) Mongalla Province, Sudan, November 1940, T. W. CHORLEY; 118 males and 143 females, 6 males and 9 females, 14 males and 12 females, 8 males and 17 females, and 13 males and 24 females respectively from five different host-individuals, Lango District, Uganda, March 1942, T. R. F. Cox.

The species appears to be normally rather uncommon, but occasionally very abundant. Of twelve skins examined (by dissolving the hair), three were not infested.

Damalinia spinifer n. sp.
(Figs. 10-13)

A Tricholipeuroid form, closely related to *D. parkeri* (Hopkins), from which it is easily distinguished by its much stouter build. From other species with a similar facies it is readily separated by the male genitalia and the structure of the terminal segments of the abdomen. In several characters it has a close resemblance to *D. ourebiae*, but I believe these resemblances to be instances of convergence. Colour pale, the tergal and pleural plates being neither very extensive nor strongly sclerotised.

Male (fig. 10) — Length 1.84 mm. Frontal angle about 65°. Total index 3.80. Head rather less than 1 ½ times as long as broad (index 1.41); frontal concavity wide and shallow; preantennal region with markedly convex sides; temples with strongly convex sides, but only projecting slightly posterior to vertex; trabeculoid processes very feebly sclerotised. First segment of antenna considerably enlarged, constituting about half the total length, second segment distinctly shorter than the third. Postepistomal row composed of about 12 small setae, row on vertex of about 12 still smaller setae, temporal setae few and small (4 on each side).

Thorax almost as in *parkeri*. Legs short and stout.

Abdomen broadest at second segment, thence tapering regularly, index 2.39, sides very slightly convex, fairly strongly crenulated. Tergal plates single, fairly large but weakly sclerotised. Intersegmental sclerites Y-shaped. Genital apodemes well developed. Spiracles very small and poorly sclerotised, almost colourless. Terminal tergite of abdomen ending in a distinct median point, on each side of which the outline of the tergite is concave and clothed with conspicuous setae.



Fig. 13 — *Damalinia spinifer* n. sp., genital region of female.

Genitalia (fig. 12) very like those of *parkeri*, the endomeres longer, not so straight, and much sharper-pointed; copulatory sac clothed with spicules and

plaques very much as in *parkeri* but the dagger-shaped sclerite replaced by two ovoid sclerites.

Female (fig. 11) — Length 1.75 mm. Total index 3.61.

Cervical index 1.30, temples lesse convex than in male. Antenna with third segment considerably the longest.

Abdomen with almost parallel sides, index 2.22. Subgenital plate not unlike that of *parkeri,* but the two projections bordering the concavity at its apex without setae and almost spine-like, the concavity itself very much deeper than in *parkeri* (fig. 13). Gonapophyses hardly distinguishable from those of *parkeri.*

Type-material — Holotype male, allotype female and fourteen male and eighteen female paratypes from a specimen of Bright's gazelle, *Gazella* (*Nanger*) *granti brighti* Thomas, shot near Moroto, Karamoja District, Uganda, on 16.x.1941, by myself. Other paratypes include 119 males and 195 females obtained from other specimens of the same host, shot at the same and other localities in Karamoja during September and October 1941 by Mr. T. W. CHORLEY and myself.

The species is apparently common. The dissolved hair from five skins yielded 20 males 32 females 192 nymphs, 42 males 78 females 254 nymphs, 33 males 48 females 169 nymphs, 15 males 19 females 52 nymphs, and 24 males 37 females 84 nymphs, respectively. None of the skins were uninfested.

Damalinia annectens n. sp.
(Figs. 14-17)

A moderately stout Tricholipeuroid species, easily distinguished from all other known Tricholipeuroid forms by the shape of the frontal concavity, and by the genitalia. It exhibits a most interesting combination of the features supposed to be characteristic of *Tricholipeurus* and of *Damalinia,* the frontal concavity being very like that of *Damalinia crenelata* (Piaget), the general facies strongly Tricholipeuroid, and the male genitalia of the Damalinioid type. Colour not very dark, the tergal plates being rather well sclerotised but not very extensive, especially in the female.

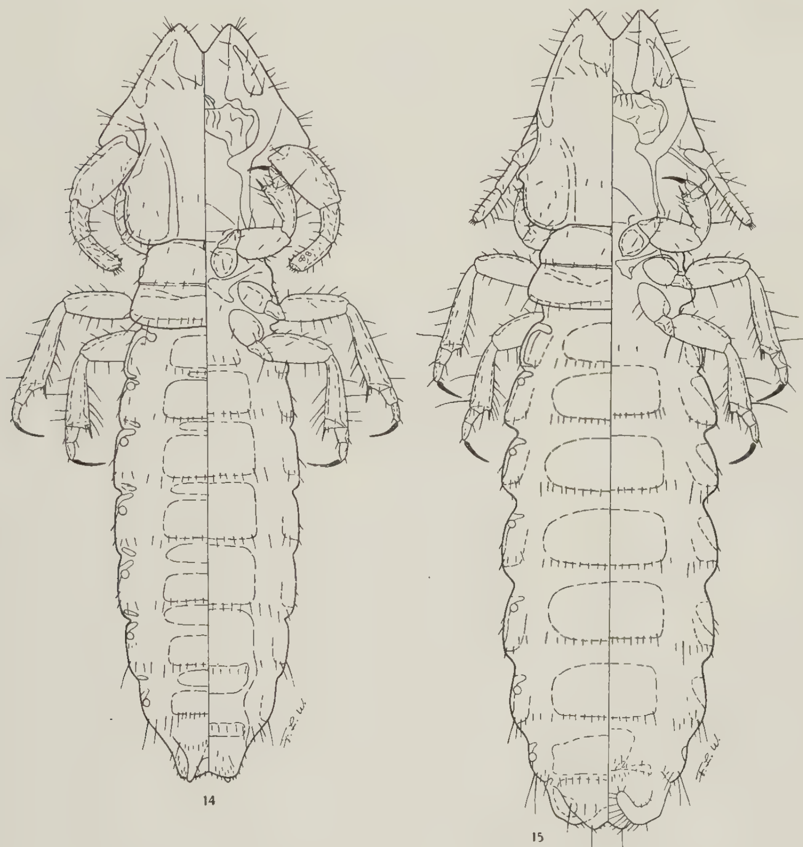
Male (fig. 14) — Length 1.81 mm. Frontal angle about 30°. Total index 4.46.

Head rather long (index 1.43); frontal notch deep and almost straight-sided, its apex rounded off; preantennal region with nearly straight, markedly convergent sides; temples only slightly convex and projecting only a very little beyond the hind margin of the vertex; trabeculoid processes rather well sclerotised towards their wedge-shaped apices. First segment of antenna much enlarged, constituting over half the total length of the antenna, second segment very short but markedly stouter than the third, third segment with the usual pair of peg-like spines and also with its inner margin very distinctly toothed. Post-epistomal row composed of eight or nine rather large setae, row on vertex comprising only four much smaller setae, temporal setae small and very few (three on each side, excluding marginal and submarginal setae).

Thorax with sides almost straight and only diverging slightly posteriorly; prothorax with a large spiracle, a small anterolateral seta and an oblique row of three hind-marginal setae on each side, tergocentral seta no larger than the others. Pterothorax with a row of about 18 hind-marginal setae, of which the two outermost on each side are very much larger than the rest. Legs rather large, but without characters of special interest.

Abdomen with index 2.65, sides almost parallel but very strongly crenulated. Tergal plates narrow but deep and well sclerotised, accessory plates present on segments 1 to 6, the anterior ones very shallow but the posterior ones almost

as large as the main plates. Intersegmental sclerites very strongly sclerotised (almost black), not Y-shaped but single and wedge-shaped. Genital apodemes present but not conspicuous. Spiracles large and conspicuous. Terminal tergite of abdomen ending in two very conspicuous points.



Damalinia annectens n. sp. — Fig. 14: Male; fig. 15: female.

Genitalia very unusual; parameres very much curved; endomeres as shown in fig. 16; copulatory sac densely clothed with small spines and apparently without any larger sclerotic areas. Unfortunately I have failed to find a specimen with the genitalia extruded.

Female (fig. 15) — Length 2.09 mm. Total index 3.96.

Cervical index 1.25, sides of preantennal region and of temples slightly more convex than in male. Antenna with first segment slightly stouter and shorter than second, second and third subequal.

Abdomen slightly stouter than that of male (index 2.42), tergal plates single and intersegmental sclerites absent. Subgenital plate not projecting posteriorly. Gonapophyses with foot-shaped ends, rather like those of *D. martinaglia* (Bedford) (fig. 17).

Type-material — Holotype male, allotype female and 53 male and 54 female paratypes collected from skins of Uganda bushbuck, *Tragelaphus scriptus bor* Heuglin, obtained in Lango District, Uganda, in March 1942 by Mr. T. R. F. Cox,

and in Buruli District, Uganda, by Mr. T. W. CHORLEY; the types are from the former locality.



Damalinia annectens n. sp. — Fig. 16: Male genitalia; fig. 17: genital region of female.

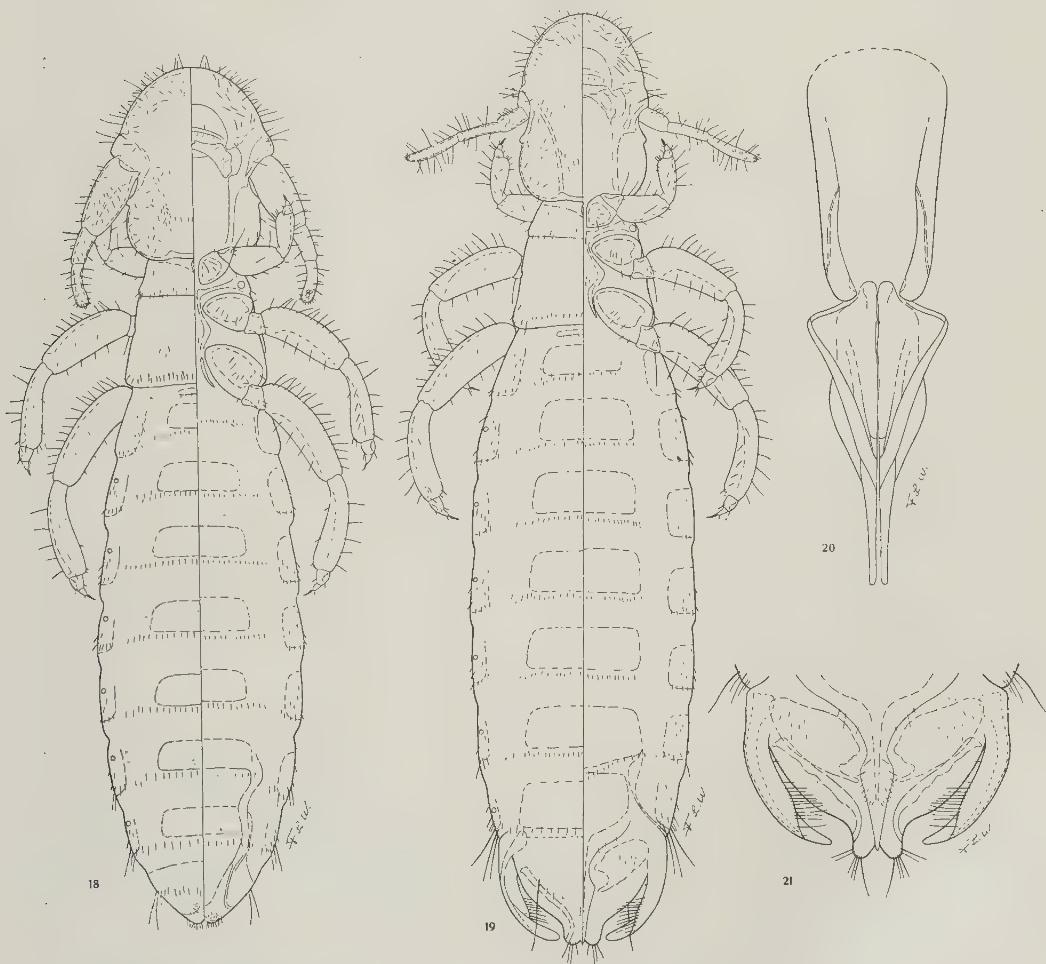
Normally a very uncommon species, but found in large numbers on occasional specimens of the host. Sixteen skins were examined by dissolving the hair, of which eight produced no specimens of *Damalinia*. The remainder produced 3 nymphs, 2 males 2 nymphs, 1 female 3 nymphs, 4 males 5 females 26 nymphs, 2 males 1 female 2 nymphs, 45 males 49 females 273 nymphs, 1 male 1 female 3 nymphs, and 1 female 4 nymphs, respectively. An attempt was made to ascertain whether young or adult specimens of the host were more heavily infested. Of 8 skins of young animals, 4 were not infested and the remainder had an average of 3 adults and 9 nymphs; of 8 adult skins 4 were not infested and the remainder bore an average of 25 adults and 70 nymphs. But almost the whole of this high average on adult hosts is accounted for by the single heavily infested skin, the average excluding this specimen being 2 adults and 3 nymphs. The apparent difference between the infestations of young and adult hosts is, therefore, almost certainly not significant. Of the total specimens obtained 54 were males, 58 females, and 316 nymphs.

Damalinia conectens n. sp.
(Figs. 18-21)

A most remarkable species, with the shape and head-chaetotaxy of certain species hitherto referred to *Bovicola,* while the general facies is Tricholipeuroid and the genitalia are of the type found in such extreme Tricholipeuroid forms as *D. victoriae* except that the endomeral plate still shows very clearly its origin from two fused endomeres. By picking out individual characters of this insect

it would be easy to refer it to either *Bovicola* or *Tricholipeurus* or to erect a new genus for it, and I regard its characters as complete proof that these two supposed genera cannot be maintained. In some points, especially the fact that the sclerotic anterior margin of the head is unbroken in the median line, the species resembles *D. ovis* (Schrank), and I do not exclude the possibility that there may be a fairly close relationship with the latter species. In head-structure and in the great length of the thorax the species appears to be very primitive, but the male genitalia are of a very specialised type. The colour is very pale, the tergal and pleural plates being small and weakly sclerotised.

Male (fig. 18) — Length 2.45 mm. Frontal angle not measurable, the frons being smoothly convex. Total index 4.29.



Damalinia conectens n. sp. — Fig. 18: Male; fig. 19: female; fig. 20: male genitalia; fig. 21: genital region of female.

Head nearly 1 ½ times as long as broad (index 1.45); preantennal region strongly and smoothly convex, semicircular; trabeculoid processes extremely short and broad, with rounded apices; temples moderately convex, not projecting behind level of vertex. Antenna with first segment much enlarged, com-

prising nearly half the total length, second and third segments subequal, third distinctly expanded apically and bearing the usual pair of short spines. Eye small but very prominent. Setae of preantennal region small, arranged in a continuous, rather irregular row of about 30, not distinctly divided into groups, a group of three setae on each side internal to the antennal fossa, setae of vertex about 18 in number, forming a single row in the median area but irregularly arranged at the sides and merging with the temporal setae, of which there are about 12 on each temple.

Thorax most exceptionally long, about as long as its greatest width, the divisions between the three segments clearly indicated at the sides, the sides almost straight and diverging gently and gradually in a posterior direction. Prothoracic spiracle small; chaetotaxy of prothorax normal, with a small anterolateral seta, a small tergocentral seta and a hind-marginal row on each side, the row consisting of about 8 small setae on each side, much less oblique than usual, and distinctly irregular. Hind marginal row of setae on pterothorax composed of about 30 setae, in front of which there are a few other irregularly-disposed setae. Fore legs short and stout, second and third pairs of legs long and slender.

Abdomen widest at the fourth segment, index 2.73, sides very slightly unduiant but not at all crenulated. Tergal plates single, small, poorly sclerotised, pleural plates very poorly sclerotised. All normal segments with a rather irregular single row of about 30 very small hind-marginal setae. Intersegmental sclerites absent. Genital apodemes well developed but rather weakly sclerotised. Spiracles very small and inconspicuous but present, as usual, on segments 2 - 7. Terminal tergite of abdomen with two small setiferous lobes which project dorsally, medially and in a slightly anterior direction.

Genitalia (fig. 20) of the same general type as in *victoriae;* parameres fused at their apices to form a V; endomeres fused basally but terminally appearing as a pair of closely-approximated but perfectly distinct straight rods; copulatory sac clothed with small spicules and plaques, without any large sclerotic pieces.

Female (fig. 19) — Length 2.70 mm. Total index 4.32.

Head much as in male, but preantennal region even more convex and temples less convex, cervical index 1.53; trabeculoid processes hardly developed; antenna long and slender, first segment much the shortest and stoutest, third slightly longer than second and slightly expanded towards the apex.

Abdomen broadest at the fourth segment, but very little narrower near the apex, index 2.85. Bilobed apex of abdomen strengthened by a pair of very conspicuous sclerotic rods running in an antero-exterior direction. A conspicuous small round spermatheca is present. Gonapophyses not remarkable, their apices not much expanded, fringed on the inner side with rather long setae (fig. 21).

Type-material — Holotype male, allotype female and 45 male and 56 female paratypes collected, together with 124 nymphs, from a klipspringer, *Oreotragus oreotragus aureus* Heller, shot by T. W. Chorley on Loriu Hill, Jie County, Karamoja District, Uganda on 28-II-1942. A second specimen of this host, also obtained by Mr. Chorley, was not infested.

REFERENCES

CLAY. T., 1940, Genera and species of Mallophaga occurring on gallinaceous hosts. *Proc. Zool. Soc. London,* (B), 110: 1-120.

ELLERMAN, J. R., 1940, *The families and genera of living rodents.* London.

HOPKINS, G. H. E., 1941, Stray notes on Mallophaga, nos. 9-14, *Ann. Mag. Nat. Hist.* (11) 7: 35-50.

KÉLER, S., 1938, Baustoffe zu einer Monographie der Malophagen, I. Teil, Uberfamilie der Trichodectoidea, *Nova Acta Leopoldina,* N. F., 5: 395-467.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 29-35
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DO FERRO FACILMENTE LIBERAVEL DO SANGUE POR MEIO DO MÉTODO DO ÁCIDO PROTOCATÉQUICO [1]

RUBENS SALOMÉ PEREIRA

Para a realização do programa de pesquisas elaborado pelo Departamento de Zoologia Médica e Parasitologia, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade de São Paulo, tornou-se necessário estabelecer-se processo conveniente para a dosagem do ferro facilmente liberavel do sangue. À vista dos excelentes resultados obtidos pelo emprego do método de SALOMÉ PEREIRA (1) na determinação do ferro total, e na do sérico (2, 3, 4, 5), procurámos aplicá-lo tambem ao doseamento do *Fe* pseudohemoglobínico (6, 7, 8).

Alem do ferro que faz parte do mecanismo do fermento respiratório, admite-se hoje, geralmente, a existência de três fórmas desse elemento no sangue : a hemoglobínica, a sérica e a facilmente liberavel — "leicht abspaltbare Bluteisen", de BARKAN. Numerosos são os estudos feitos recentemente com o fito de precisar-se a significação do ferro sérico e do facilmente liberavel do sangue, e interesse crescente em conhecer-se o mecanismo de transporte desse metal na corrente sanguínea muito se estimula pela necessidade de compreender-se melhor essa fase do metabolismo do ferro. O presente trabalho, que é parte de largo programa de pesquisas, visa pôr à disposição dos investigadores meio seguro, e relativamente simples, de determinação do ferro pseudo-hemoglobínico.

MÉTODO

A dosagem do ferro facilmente liberável, do sangue encerra as fases seguintes :

a) ionização do ferro;
b) desproteinização do sangue;
c) determinação do ferro presente no líquido incolor e límpido resultante do tratamento anterior.

---

1 Recebido para publicação a 8 de Dezembro de 1942.
Trabalho realizado no Departamento de Zoologia Médica e Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

a) *Ionização do ferro*

BARKAN (9) desfibrina o sangue, filtra-o através de algodão de vidro, dilue-o com água, na proporção 1 : 4; no caso de usar sangue não desfibrinado, aproveita o poder anticoagulante da hirudina, ou o do polianetolsulfeonato de sódio, de Roche. O referido pesquisador, que usa a o-fenantrolina como agente cromógeno, não investigou a influência do ionio citrato, nem a do oxalato, sôbre o desenvolvimento da côr do complexo ferroso, mas o trabalho de HUMMEL & WILLARD (10), e o de FORTUNE & MELLON (11) dão interessantes informações sôbre o método preferido por BARKAN. SALOMÉ PEREIRA (1) verificou que o ionio citrato não exerce ação prejudicial sobre a côr do complexo *Fe-ácido protocatéquico,* e no citado trabalho recomenda o emprego do citrato de amónio a-fim de evitar-se o efeito, em certos casos prejudicial, do ionio PO_4. Assim, aos anticoagulantes citados por BARKAN, o método do ácido protocatéquico permite que se acrescentem o citrato e o oxalato. No presente estudo usámos sistematicamente o citrato de sódio.

Em tubos de centrifugação de 15 cm^3 de capacidade, graduados à altura de 0,5 — 1 — 1,5 — 2 — 2,5 — 3 — 3,5 — 4 — 4,5 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 e 10 cm^3, põem-se de 0,4 - 4 cm^3 duma solução de citrato de sódio a 1 ‰ e em seguida, rigorosamente medidos, 0,1 - 1 cm^3 de sangue. Agita-se cuidadosamente a diluição feita, adiciona-se *ClH* 0,2 n em quantidade igual a metade do volume ocupado pelo sangue diluido, arrolham-se os tubos e colocam-se em estufa regulada, a 37°C, durante 16-24 horas. Terminado o período de incubação, são eles retirados da estufa e deixados em repouso até que a temperatura da solução ácida seja a do ambiente.

b) *Desproteinização do sangue*

Ao sangue assim tratado ajunta-se volume de ácido tricloracético a 20 %, igual ao de ácido clorídrico usado para ionizar-se o *Fe.* O desproteinizante deve ser posto às gotas, cautelosamente, e a mistura deve fazer-se cuidadosa e completamente. A altura alcançada pelo líquido no tubo, deve corresponder a uma das graduações especificadas. Deixa-se este em repouso durante cerca de meia hora, e, em seguida, centrifuga-se energicamente durante 15 minutos, à velocidade de 2.500 r.p.m. : o coágulo se separa inteiramente e o líquido incolor e límpido que se obtem, encerra todo o ferro ionizável do sangue.

c) *Determinação do ferro presente no líquido incolor e límpido resultante do tratamento anterior*

A dosagem do *Fe* fazemô-la por meio do método de SALOMÉ PEREIRA (1).

a) *Ácido protocatéquico.* Num balão volumétrico, de 100 cm^3, põe-se 1gr. de ácido protocatéquico e dissolve-se à temperatura ambiente por meio de álcool etílico a 50 %. Perfaz-se o volume de 100 cm^3 por meio do mesmo solvente.

b) NH_4OH 3n

c) SO_4H_2 3n

d) Mistura de $SO_4(NH_4)_2$ n (4 partes) e NH_4OH n (uma parte)

Uma parte alíquota, exatamente medida, do líquido resultante da desproteinização tricloracética, transfere-se para um tubo de experiências de vidro "Pyrex", ou "Jena", de 100 mm. x 13 mm., graduado à altura de 1,5 — 2 — 2,5 — 3 — 4 — 5 — 7,5 e 10 cm^3. Ajuntam-se 0,05 - 0,1 cm^3 do reagente (a), e, per cm^3 da solução tomada para a análise, 0,1 cm^3 de (b). Adiciona-se, então, gota a gota, sob agitação constante, o reativo (d) até a côr vermelha caraterística desenvolver-se plenamente, e perfaz-se volume conveniente, marcado na parede do tubo, por meio da mistura (d). Ao cabo de 10-20 minutos determina-se a extinção dada pelo fotómetro de Pulfrich, e empregam-se cubas de espessura conveniente e o filtro "S-50". Durante o processo faz-se, sob condições idênticas, um *branco*, que servirá de líquido de compensação : elimina-se assim, automaticamente, a ação das impurezas de ferro porventura presentes nos reativos. Se a adição de (b) determinar por sí só o aparecimento da côr vermelha, o que significa estar alcalino o meio, convem acidificar levemente a solução, por meio de SO_4H_2 3n, e levá-la em seguida ao pH útil, pela mistura (d).

A concentração do *Fe* facilmente liberável no sangue estudado, é dada pela fórmula seguinte :

mgr. *Fe* facilmente liberável em 100 cm^3 de sangue $= \dfrac{0{,}93 \times k \times V}{v}$ em que *k* é o coeficiente de extinção; *V*, o volume da solução corada; *v*, o de sangue correspondente à alíquota tomada para a dosagem.

Influência da diluição do sangue — A-fim-de verificar a influência da diluição do sangue sôbre os resultados da análise, fizemos as experiências que se resumem no quadro seguinte :

INFLUÊNCIA DA DILUIÇÃO DO SANGUE SÔBRE O *Fe* PSEUDOHEMOGLOBÌNICO

VOLUME DE SANGUE TOMADO PARA A ANÁLISE Cm³	DILUIÇÃO	VOLUME DE SANGUE CORRESPONDENTE À PARTE ALÍQUOTA TOMADA Cm³	VOLUME FINAL DA SOLUÇÃO CORADA Cm³	D	E	k	*Fe* PSEUDO-HEMOGLOBÍNICO PER 100 CM³ DE SANGUE mgr.
0,10	1:10	0.05	1,5	37	0,432	0,086	2,399
0,20	1:10	0,10	2,5	30	0,523	0,105	2,441
0,25	1:10	0,20	5	30	0,523	0,105	2,441
0,30	1:10	0.15	5	40	0,398	0,080	2,480
0,40	1:10	0,30	10	59	0,229	0,076	2,355
0,50	1:10	0.375	10	50	0,301	0,100	2,480
0,20	1:5	0 10	1,5	13,5	0,870	0,174	2,441
0,40	1:5	0,20	2,5	9	1,046	0,209	2,430
0,50	1:5	0,25	5	23	0,638	0,128	2,381
0,60	1:5	0,30	5	62		0,208	2,418
0,80	1:5	0,40	10	33	0,482	0,161	2,496
1,00	1:5	0,50	10	28	0,552	0,184	2,445

Com esses dados em mãos, obtem-se o que se segue :

Diluição	*Média*	*Erro médio*	*Erro padrão*	*Coeficiente de variação*
1 : 10	2,433	0,0443	0,0198	1,821
1 : 5	2,435	0,0344	0,0154	1,413

A diluição 1:5 parece ser a preferível. Releva, porem, notar que casos se podem apresentar em que seja mais cômodo diluir-se o sangue na proporção de 1:10, como, *v. g.*, quando houver, à disposição do pesquisador, alguns centésimos de cm^3, apenas, para a determinação de

Fe pseudohemoglobínico. Si bem que o número de dosagens feitas seja pequeno, para fins de análise estatística, o quadro acima revela que o erro cometido seria praticamente desprezivel.

Influência do anticoagulante — A influência do anticoagulante se reflete nos resultados fornecidos pelo método de dosagem do ferro, desde que aquele introduza na solução desproteinizada ionios capazes de interferir no desenvolvimento da côr. No caso do tiocianato, *v. g.*, os corpos orgânicos hidroxilados dão com o *Fe* complexos estáveis, de sorte que os citratos, por ex., não devem ser usados para fins de evitar a coagulação do sangue. Os citratos, os oxalatos, alem de outros, interferem no desenvolvimento da côr ametista, no método de GREGORY, de modo que tambem eles desaconselham o processo do ácido salicílico (3). Cousa semelhante se dá quando se emprega como agente cromógeno a salicilaldoxima, no método estudado por HOWE & MELLON (12). Esses exemplos, que se poderiam multiplicar (3), mostram que a escolha do processo de dosagem do *Fe* é variável dependente do anticoagulante usado, ou que, se este fôr a variável dependente, aquele será a independente.

O método do ácido tioglicólico, o da α - α' dipiridina, o da o-fenantrolina, o do ácido protocatéquico, alem de extremamente sensíveis, apresentam a vantagem, no caso de que nos ocupamos, de serem indiferentes à ação dos anticoagulantes geralmente usados.

Reproductibilidade dos resultados — A técnica descrita permitiu-nos a obtenção dos resultados que se veem no quadro seguinte, para a obtenção do qual usámos sangue do mesmo cão que serviu para os estudos expostos no presente trabalho.

REPRODUCTIBILIDADE DOS RESULTADOS

(Diluição 1:5)

VOLUME DE SANGUE TOMADO PARA A ANÁLISE cm³	VOLUME DE SANGUE CORRESPONDENTE A PARTE ALIQUOTA TOMADA cm³	VOLUME FINAL DA SOLUÇÃO CORADA cm³	D	E	k	*Fe* FACILMENTE LIBERÁVEL PER 100CM³ DE SANGUE mgr.
0,10	0,05	1,5	37,0	0,432	0,086	2,399
0,10	0,05	1,5	36,4	0,439	0,088	2,455
0,20	0,10	1,5	13,5	0,870	0,174	2,427
0,20	0,10	1,5	13,8	0,860	0,172	2,399
0,30	0,15	2,5	17,0	0,770	0,154	2,387
0,30	0,15	2,5	16,6	0,780	0,156	2,418
0,40	0,20	3,0	13,2	0,879	0,176	2,455
0,40	0,20	3,0	13,5	0,870	0,174	2,427
0,50	0,25	5,0	22,4	0,650	0,130	2,418
0,50	0,25	5,0	22,0	0,658	0,132	2,455
0,60	0,30	5,0	17,0	0,770	0,154	2,387
0,60	0,30	5,0	17,8	0,750	0,150	2,325
0,80	0,40	7,5	52,0	0,284	0,142	2,476
0,80	0,40	7,5	53,0	0,276	0,138	2,406
1,00	0,50	10,0	40,0	0,398	0,133	2,474
1,00	0,50	10,0	42,0	0,377	0,126	2,344

Média	2,416
Erro médio	0,0415
Erro padrão	0,0107
Coeficiente de variação	1,718

Experiências de recuperação — A-fim-de verificar a influência das várias operações sôbre a recuperação do ferro mineral ajuntado ao sangue, fizemos as experiências que se resumem no quadro seguinte. A cada cm³ de sangue diluido (1:5) ajuntaram-se 0,2 cm³ duma solução de Cl_3Fe em que havia 0,053 mgr. de *Fe* per cm³. O sangue foi retirado do cão referido acima.

EXPERIÊNCIAS DE RECUPERAÇÃO

Fe FACILMENTE LIBERAVEL CORRESPONDENTE À PARTE ALÍQUOTA TOMADA PARA DOSAGEM (CALCULADO) γ	*Fe* MINERAL ADICIONADO, CORRESPONDENTE À PARTE ALÍQUOTA TOMADA PARA DOSAGEM (CALCULADO) γ	*Fe* TOTAL NA SOLUÇÃO CORADA (CALC.) γ	VOLUME FINAL DA SOLUÇÃO CORADA cm³	D	k	*Fe* TOTAL ACHADO γ	*Fe* RECUPERADO %
5,02	11,02	16,04	5	45	0,347	16,14	100,90
5,02	11,02	16,04	5	45	0,347	16,14	100,90
5,02	11,02	16,04	5	46	0,337	15,67	96,64
8,05	17,65	25,70	7,5	42	0,377	26,30	103,40
8,05	17,65	25,70	7,5	43	0,367	25,60	99,43
8,05	17,65	25,70	7.5	43	0,367	25,60	99,43
10,05	22,05	32,10	7,5	35	0,456	31,81	98,68
10,05	22,05	32,10	7,5	34	0,469	32,71	102,77
10,05	22,05	32,10	7,5	36	0,444	30,98	94,92
15,10	33,13	48,23	10	30	0,523	48,64	101,24
15,10	33,13	48,23	10	32	0,495	46,04	93,39
15,10	33,13	48,23	10	31	0,509	47,34	97,31

Esses resultados confirmam as observações de HEILMEYER (13), que invalidaram as críticas de FOWWEATHER (14) e de TOMPSETT (15), em relação à desproteinização tricloracética.

* * *

DETERMINAÇÃO DO FE TOTAL E DA HEMOGLOBINA DO SANGUE DO CÃO QUE SERVIU PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE TRABALHO

A-fim-de calcular-se a percentagem do ferro pseudohemoglobínico, em relação ao ferro total, fizeram-se as determinações seguintes :

DETERMINAÇÃO DO *Fe* TOTAL — MÉTODO DE SALOMÉ PEREIRA (1)

VOLUME DE SANGUE TOMADO PARA A ANÁLISE cm³	VOLUME FINAL DA SOLUÇÃO CORADA cm³	D	k	*Fe* PER 100CM³ DE SANGUE mgr.	HEMOGLOBINA PER 100CM³ DE SANGUE (CALCULADA) gr.
0,05	5	36,4	0,439	40,83	12,15
0,05	5	36	0,444	41,29	12,29
0,07	5	24	0,620	41,19	12,26
0,08	5	19,5	0,710	41,27	12,28
0,10	10	36	0,444	41,29	12,29
0,10	10	36	0,444	41,29	12,29
Média..............	—	—	—	41,19	12,26

DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA — MÉTODO DE HEILMEYER (16)

VOLUME DE SANGUE TOMADO PARA A ANALISE cm³	VOLUME DA SOLUÇÃO CORADA cm³	D	E	k	HEMOGLOBINA PER CENTO gr
0,025	2,5	43	0,367	0,734	12,11
0,025	2,5	42	0,377	0,754	12,44
0,025	2,5	43	0,367	0,734	12,11
0,025	2,5	44	0,357	0,714	11,78
0,025	2,5	43	0,367	0,734	12,11
0,025	2,5	43	0,367	0,734	12,11
MÉDIA............	—	—	—	—	12,11

Os resultados obtidos assim se resumem :

Hemoglobina (gr %) 12,11
Ferro total (mgr %) 41,19
Ferro pseudohemoglobínico (mgr %) 2,416

$$\frac{\text{Ferro pseudohemoglobínico}}{\text{Ferro total}} \times 100 = 5,866$$

SUMMARY

A method for the measurement of the pseudohemoglobin iron of whole blood is described. It involves incubation with dilute hidrochloric acid, elimination of hemoglobin with trichloracetic acid (Barkan) and the measurement in the Zeiss-Pulfrich photometer of the iron complex of protocatechuic acid (Salomé Pereira).

Reagents :

a) Hydrochloric acid, 0,2 N
b) Trichloracetic acid, 20 per cent solution
c) Ammonium hydroxide, 3 N
d) Protocatechuic acid, 1 per cent solution in 50 per cent ethyl alcohol
e) N Ammonium hydroxide (1 part) — N Ammonium sulfate (4 parts) mixture

To blood (0,1-1ml.) first diluted with 4 volumes of a 1 ‰ solution of sodium citrate, used as the anticoagulant, in a centrifuge tube graduated at 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 ml., add half a volume (0,25 to 2,5 ml.) of reagent (a). Keep at 37°C for at least 2 hours, preferably overnight. Cool to room temperature, add half a volume (0,25 to 2,5 ml.) of reagent (b), mix cautiously but thoroughly and let stand for about 1 hour at room temperature. Centrifuge the tube for about 15 minutes at 2.500 revolutions per minute. The total volume should correspond to one of the marks on the wall of the tube, if not, make up exactly to the nearest graduation with redistiled water. The clear supernatant fluid is carefully decanted into a clean, dry test tube 75x11 mm., and an aliquot of it is measured into a Pyrex text tube 75 x 11 mm., graduated at 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7,5, and 10 ml. with a pipette graduated to tenths. To the cold, acid solution 0,1 ml of reagent (c) for each ml measured, 0,05 to 0,1 ml of reagent (d), and reagent (e), drop by drop, are successively added with thorough mixing after each addition until the characteristic color develops.

The contents of the tube are then diluted to án appropriate volume. A blank is carried through the entire procedure, at the same time, under exactly the same conditions, to serve as compensating liquid.

The photometric measurements are made with the Zeiss-Pulfrich photometer. The colored solution is run into the absorption cell of the instrument, the blank is placed in the other cell of the photometer, and the extinction is determined with the use of filter "S-50" and cells of appropriate length.

The color readings must be made within 10 to 20 minutes.

Comments on the various steps of the method are made.

BIBLIOGRAFIA

1. SALOMÉ PEREIRA, R., 1941, A new photometric method for the determination of iron. *J. Biol. Chem.*, 37: 417-428.
2. SALOMÉ PEREIRA, R., 1941, Novo método para a determinação do ferro sérico, *Rev. Brasil. Biol.*, 1: 271-277.
3. SALOMÉ PEREIRA, R. & ARAUJO, J. O., 1941, O Ferro em Biologia, *Rev. Fac. Med. Vet., São Paulo,* 2: 67-103.
4. ARAUJO, J. O., 1941, *Sídero-função placentária,* Tése Fac. Med. Univ. S. Paulo, Brasil.
5. GUIMARÃES, L. M., 1942, *Contribuição ao conhecimento da patogenia da ancilostomose canina,* Tése Fac. Med. Vet. Univ. São Paulo, Brasil.
6. BARKAN, G. & SCHALES, O., 1937, Chemister Aufbau und physiologische Bedeutung des "leicht abspaltbaren Bluteisens". Z. *physiol. Chem.*, 248: 96-116.
7. BARKAN, G. & SCHALES, O., 1938, Bildungsmöglichkeiten und Eigenschaften der Pseudohemoglobine, Z. *physiol. Chem.,* 253: 83-104.
8. BARKAN, G. & WALKER, B. S., 1939, The blood red cell as a source of the iron and bilirubin of the blood plasma. *J. Biol. Chem.,* 131:447-454.
9. BARKAN, G. & WALKER, B. S., 1940, Determination of serum iron and pseudohemoglobin iron with o-phenanthroline, *J. Biol. Chem.*, 135: 37-42.
10. HUMMEL, F. C. & WILLARD, H. H., 1938, Determination of iron in biological materials. The use of o-phenanthroline, *Ind. Eng. Chem.* (Anal. Ed.), 10: 13-15.
11. FORTUNE, W. B. & MELLON, M. G., 1938, Determination of iron with o-phenanthroline, *Ind. Eng. Chem.* (Anal. Ed.), 10: 60-64.
12. HOWE, D. E. & MELLON, M. G., 1940, Colorimetric determination of iron with salicylaldoxime, *Ind. Eng. Chem.* (Anal. Ed.), 12: 448-450.
13. HEILMEYER, L. & PLÖTNER, K., 1937, *Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit,* Jena.
14. FOWWEATHER, F. S., 1934, The determination of iron in blood plasma, *Biochem. J.,* 28: 1160-1165.
15. TOMPSETT, S. L., 1934, Thiolacetic acid as a reagent for the determination of the inorganic iron content of certain biological materials, *Biochem. J.,* 28: 1536-1543.
16. HEILMEYER, L., 1933, *Medizin. Spektrophotometrie,* Jena.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 37-38
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

"CHELOTONYX BRASILIENSIS" N. SP., UM NOVO CURCULIONÍDEO DO BRASIL [1]

OSCAR MONTE

Instituto Biológico, S. Paulo

(Com uma figura no texto)

O gênero *Chelotonyx* Waterh., da subfamília *Ceratopinae* está representado no Brasil pela espécie típica *C. batesi* Waterh., do Amazonas. Posteriormente CHAMPION, em Biologia Centrali-Americana, IV, pt. 4, descreveu *C. fasciculatus*, do México. A presente espécie é a terceira do gênero que se descreve.

Chelotonyx brasiliensis n. sp.

Cabeça pequena quase totalmente inserida no protorax, o lado inferior mais a descoberto, ligeiramente rugosa um pouco abaixo dos olhos; a região gular



Fig. 1 : *Chelotonyx brasiliensis* n. sp.

lisa, brilhante e tendo raras escamas-espiniformes, brancas. Olhos achatados, cilíndricos, granulosos, grandes, brilhantes e situados bem junto ao rostro. Ros-

1 Recebido para publicação a 11 de Dezembro de 1942.

tro forte, preto brilhante, ligeiramente curvado, bastante pontuado, mas esta pontuação alem de grosseira está disposta em séries irregulares. A parte superior entre os olhos é lisa; pelo centro até quase ao ápice, corre uma carena bem distinta e sem pontuação. Este rostro é mais engrossado para o ápice e coberto com escamas-piliformes pretas e brancas, estas em muito pouco número. Antenas pretas e inseridas a um terço do ápice. O funículo de sete artículos sendo o primeiro um pouco maior que os outros seis. Todos os artículos tendo cerdas escuras e fortes. O escapo quase alcançando os olhos; a clava desenvolvida e escura, mas coberta por densa penugem pardacenta.

Pronoto roxo, globoso, mais estreitado junto à cabeça, com uma reentrância na porção anterior, arredondado dos lados, fortemente pontuado, coberto com escamas piliformes, pretas e brancas, as primeiras em muito maior número, e, as segundas se condensam na base, jnuto aos élitros, mais ou menos na metade da distância que vai do escudo até aos ombros.

Escutelo brilhante, castanho, liso e pequeno.

Élitros verde-azulados metálicos, mais compridos que largos, ligeiramente mais alargados que o protorax, os ombros pouco salientes, fortemente pontuados, com nove carreiras de punturas rasas, ovais e regularmente dispostas. Nos espaços intersticiais tendo escamas piliformes escuras, e uma ou outra, de côr branca.

Parte inferior do corpo verde-azulada, tendo pêlos esbranquiçados. Patas grossas, escuras, exceto os fêmures que são arroxeados, especialmente os do primeiro par. Os fêmures anteriores são claviformes e trazem quase junto ao ápice uma peça triangular denteada, sendo que o primeiro dente é muito maior que os outros (o número de dentes no único exemplar, é 1 grande e 7 pequenos em um dos fêmures, e 1 grande e 8 pequenos, no outro). As tíbias do par anterior fortemente curvadas e levemente escavadas. Patas cobertas de cerdas brancas e pretas.

Comprimento : 4.00 mm.; com o rostro 5.74 mm.; largura : 2.04 mm.

Colhido pelo autor em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 1935. Tipo depositado na minha coleção.

Diferencia-se de *C. batesi* por não ter os élitros manchados. *C. batesi* é : "d'un bronzé obscur brilant et en entier recouvert de poils grisâtres, couchés, lanugineux et formant de nombreuses mouchetures sur les élytres".

SUMMARY

CHELOTONYX BRASILIENSIS N. SP., A NEW WEEVIL FROM BRAZIL

This paper contains the description of one new species of the genus *Chelotonyx* Waterh., family *Curculionidae* and subfamily *Ceratopinae*. Heretofore the genus has been represented in South America by a single species, *Chelotonyx batesi* Waterh., from Amazonas.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 39-44
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

FAILURE OF ASCORBIC ACID TO INFLUENCE THE VARIATIONS OF THE HISTAMINE CONTENT OF RABBITS BLOOD DURING ANAPHYLACTIC SHOCK [1]

F. EICHBAUM and M. ROCHA E SILVA

Escola Paulista de Medicina, São Paulo

Instituto Biológico, São Paulo

(With 4 figures)

Contradictory experiments upon the effect of ascorbic acid on anaphylactic shock have been repeatedly reported. HOCHWALD (1), LEMKE (2) and SOLOMONICA (3) described favorable effects produced by Vitamin C upon the anaphylactic shock of guinea pigs. UNGAR and col. (4,5) have shown that ascorbic acid prevented the contraction of the sensitized uterus in response to the addition of high amounts of ascorbic acid to the perfusing fluid. As they had shown that ascorbic acid had no effect upon the contraction of the sensitized uterus in response to the addition of histamine, they concluded therefrom that ascorbic acid would prevent the liberation of histamine following the contact of the antigen with sensitized organs. According to HOCHWALD, vitamin C is unable to inhibit the combination of the antigen with the antibody, but in presence of ascorbic acid this reaction would be ineffective in discharging the histamine from the tissues. In contradistinction with the above results, SCHWARTZ & CISLOGHI (6), van NIEKERK (7), CORREIA (8), RAFFEL & MADISON (9) and COHEN (10) were unable to show any effect whatsoever of ascorbic acid upon *in vitro* or *in vivo* anaphylaxis in the guinea pig. In the rabbit, GIROUD & GIROUD (11) have shown that 9 out of 17 animals treated with ascorbic acid, did not show any symptom after the provocative injection and the rest of the animals only showed very slight symptoms; 17 sensitized rabbits which did not receive ascorbic acid died in shock and 4 showed heavy symptoms. EYER, DRAGSTEDT & ARELLANO (12) treated

---

[1] Received for publication December 12, 1942.
The experiments reported in this paper were performed in the Department of Biochemistry and Pharmacodynamics of the Instituto Biologico of São Paulo.

18 dogs with ascorbic acid during the sensitization period; immediately before the provocative injection, the ascorbic acid was estimated in the blood and in several animals the values were considerably high. Notwithstanding that, the severity of the shock was entirely comparable with that of the control animals, not treated with ascorbic acid. A thorough discussion of the literature on the influence of ascorbic acid upon anaphylactic shock and human allergy can be found in the paper of WALZER (15).

In view of these highly contradictory reports, we decided to reinvestigate the question. For a quantitative analysis of the phenomenon, the rabbit appeared to be the choice animal, since the blood histamine in this animal species undergoes marked changes as a consequence of the injection of antigen on prepared animals, as shown firstly by ROSE & WEIL (14). On the other hand, samples of blood of sensitized rabbits, when put *in vitro* in contact with the antigen, show diffusion of the histamine from cells to plasma, as shown by KATZ (15), DRAGSTEDT and col. (16) and ROSE & BROWNE (17).

The purpose of this paper is to verify whether ascorbic acid exerts any influence upon the intensity of the shock or upon the changes of blood histamine as they occur after the provocative injection of antigen in prepared rabbits.

MATERIAL AND METHODS

Nineteen rabbits were sensitized to horse serum by repeated injections (3 to 10) of the antigen during an interval of 15 to 25 days. One month after the first injection the precipitin titer was determined and a record of the carotid blood pressure was taken as an objective criterion for the intensity of the shock. Some of the animals were anesthetized with *Dial* (Ciba) and the others with *Dial "liquid"* (Ciba) which contains dial associated with urethane. In all of the cases, a complement with ether was used. Samples of blood were taken before and after the provocative injection, and the histamine estimated by CODE's method (18).

In vitro experiments with heparinized rabbits blood obtained by puncture of the heart were performed by the following procedure : 30 to 40 cc of heparinized blood obtained by puncture of the heart were distributed in 3 to 4 flasks containing each 8 to 10 cc of the total heparinized blood; to the 1st sample, saline (1 cc), to the second one, 1 cc of neutralized solution of ascorbic acid (containing 14 mgs), to the third one, the antigen (1 cc of a dilution 1/5 of horse serum) and to the fourth one, 1 cc of a mixture containing ascorbic acid and the antigen, in the same amounts as used in 2 and 3. After 10 minutes at room temperature, the four samples were simultaneously centrifuged for 15 minutes at 3,500 r.p.m. and the supernatants carefully syphoned off. Duplicate samples of the different plasmas were collected for histamine estimation, after extraction by CODE's method. The figures indicated in the tables represent the averages of the histamine content of the two duplicates.

RESULTS

Thirteen rabbits were submitted to *in vivo* experiments by recording the carotid blood pressure, and 6 were submitted to heart puncture for the *in vitro*

experiments. From the 13 rabbits submitted to *in vivo* experiments, 8 were injected with 200 to 500 mgs of ascorbic acid, intravenously, a few minutes to 30' before the provocative injection. In every case, 3 cc of undiluted horse serum were injected into the ear vein. Excepting one, all of them developed shock which were comparable to those developed by the 6 controls, which did not receive ascorbic acid. As shown in table 1, there was in every case marked decrease of the histamine content of the total blood, but there was no significant parallelism between this decrease and the severity of the shock.

TABLE 1

Influence of ascorbic acid upon the intensity of the shock and upon the histamine content of blood, before and after anaphylactic shock

N. OF THE RABBITS	ASCORBIC ACID (MGS)	PRECIPITIN TITER (1:)	INTENSITY OF THE SHOCK	CAROTID BLOOD PRESSURE, IN mm HG, AFTER:			HISTAMINE CONTENT IN 1 cc OF TOTAL BLOOD		
				0′	2.5′	5′	BEFORE (γ/cc)	AFTER: 3 TO 7′ (γ/cc)	AFTER: 10′ (γ/cc)
1	300	6400	+++	90	44	30	2.20	0.53	—
2	300	12800	+++	100	60	50	3.50	0.75	—
3	300	12800	++	100	52	60	2.55	0.87	—
4	300	25600	++	90	30	62	0.81	0.34	—
5	500	12800	++	68	60	42	1.50	0.26	—
6	200	2560	++	106	107	60	1.70	0.52	0.52
7	300	30	0	74	72	76	2.10	2.00	—
8	0	3200	+++	72	64	30	1.80	0.45	—
9	0	3200	+++	96	45	70	4.30	1.50	0.50
10	0	400	++	60	50	30	0.60	0.14	—
11	0	3200	++	97	60	60	1.00	0.23	—
12	0	6400	++	104	136	72	1.35	0.29	—
13	0	1600	±	105	98	120	1.70	0.47	0.43

Legend: +++, severe to fatal shock; ++, median shock, tendency to a slow recovery; +, median shock, tendency to a rapid recovery; ±, mild shock; 0, no shock.

In the case of the rabbit nº. 13, for instance, although the histamine reduction in the blood was considerable, the shock has been comparatively mild. It is worthy of note, however, that in the cases of severe or fatal shock, the initial histamine content of the blood was high, although no definite conclusion could be drawn due to the small number of animals tested.

It seems to us that the intensity of the shock is mainly dependent upon the conditions of anesthesia to which the animal has been submitted. Fig. 1 and 2 show the shock produced in rabbits nº. 2 and 3 by the injection of 3 cc of horse serum, immediately after the intravenous injection of 300 mgs of ascorbic acid. It is interesting to note that in the animals submitted to anesthesia by dial + urethane (Dial "liquid") there appeared a clear cut hypertensive effect during the shock : after the intravenous injection of the antigen, the pressure fell to a low level, but after a short interval it raised swiftly far above the initial values, to fall again to the shock level (figs. 3 and 4). This phenomenon could not be observed in the animals anesthetized with dial alone (figs. 1 and 2). After cutting both vagus nerves, there was a tendency for a swifter recovery. (fig. 3). This phenomenon was shown by one of us in a previous paper (19), while under the conditions of anesthesia of the above experiments, the effect was not so marked as under the Hedonal anesthesia previously used.

As can be shown in table 1, ascorbic acid was unable to modify either the intensity of the shock or the reduction of the histamine content of the blood. Even by using unphysiological amounts of ascorbic acid (500 mgs), the shock following the injection of the antigen was severe. In every case there was

marked reduction of the histamine content of the total blood, this reduction being of the same order in treated and non-treated animals.

As the reduction of the histamine content of rabbits blood in anaphylactic shock can be in part accounted for by a diffusion of the histamine from blood cells to plasma and from plasma to tissues, we tried the effect of ascorbic acid directly on samples of sensitized rabbits blood to which antigen was added in

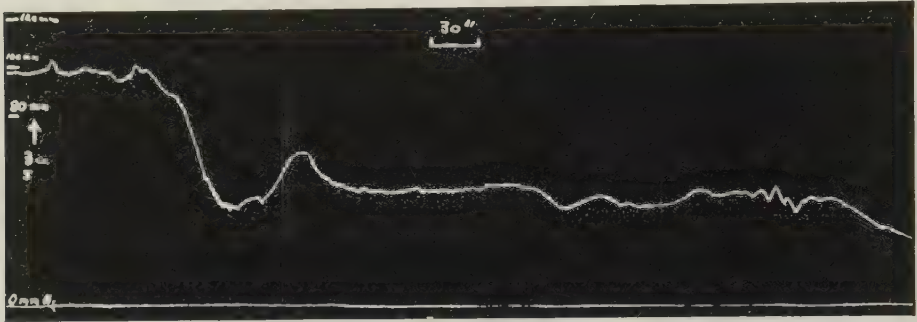


Fig. 1 — Rabbit nº. 2. Record of the carotid blood pressure; 300 mgs of ascorbic acid were injected immediately before the injection of 3 cc of horse serum. The shock was fatal (+++).

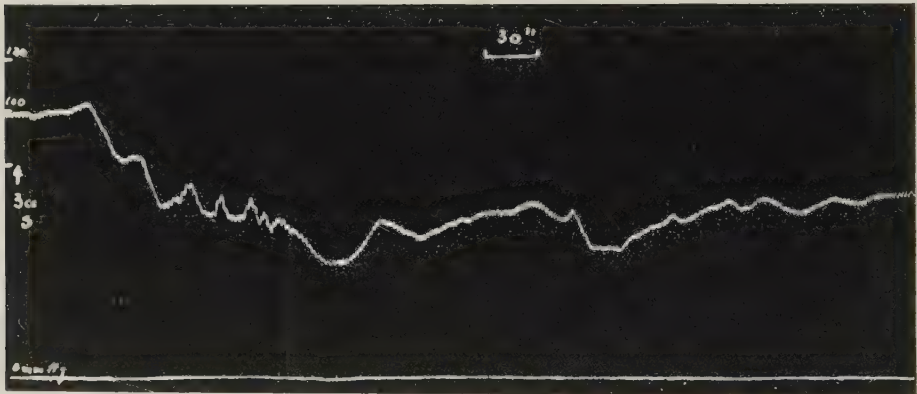


Fig. 2 — Rabbit nº. 3. Three hundred mgs of ascorbic acid were injected before the intravenous injection of 3 cc of horse serum (at the arrow). The intensity of the shock is referred to as two plus (++). Dial + ether.

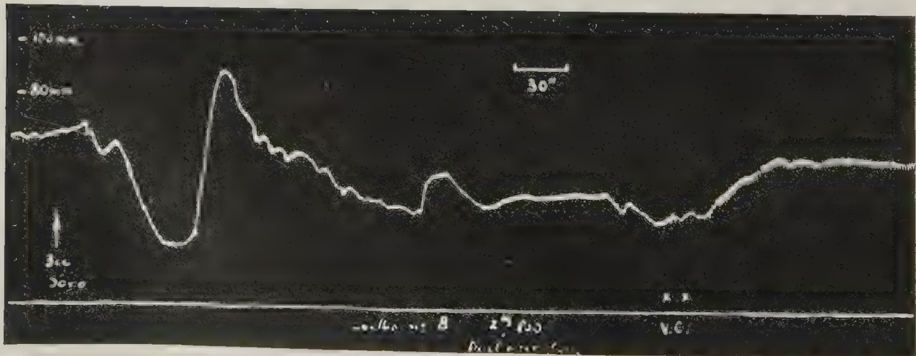


Fig. 3 — Rabbit nº. 5. Thirty minutes before the injection of 3 cc of horse serum, the animal received 500 mgs of ascorbic acid. Median shock (++). After section of both vagus nerves (at V.C.) there was a prompt recovery. Dial + urethane anesthesia.

proper amounts. Previous experiments have shown that ascorbic acid when carefully neutralized has no capacity to liberate histamine from blood cells. Added to the sensitized blood before the addition of the antigen it did not prevent the effect of the latter in liberating histamine from cells to plasma. This fact is clearly shown in three of the experiments referred to in the table 2. In the other experiments presented in the table, the antigen did not produce very marked changes in the distribution of blood histamine, but in no case did ascorbic acid produce any effect whatsoever.

TABLE 2

Influences of ascorbic acid upon the in vitro *shifting of histamine from cells to plasma following addition of the antigen to sensitized rabbits blood*

N. OF THE RABBITS	PRECIPITIN TITER (1:)	HISTAMINE CONTENT OF 1 cc OF (γ/cc)				
		TOTAL BLOOD	PLASMA + SALINE	PLASMA + ASC. ACID	PLASMA + ANTIGEN	PLASMA + ANTIGEN + ASC. ACID
14	0	1.60	0.70	0.70	—	—
15	0	1.12	0.26	0.32	—	—
16	Sensitiz. (*)	2.50	0.03	—	0.22	0.29
16	Sensitiz	2.50	0.80	0.80	0.80	1.11
17	40	2.25	< 0.07	0	1.20	1.30
6	5120	0.90	0.34	—	0.53	0.40
18	3200	1.50	0.21	0.25	0.28	0.25
19	3200	1.25	0.35	0.31	0.62	0.62
AVERAGES.......	....	1.70	0.36	0.39	0.60	0.66

(*) The animal n. 16 was sensitized, but the precipitin titer was not determined.

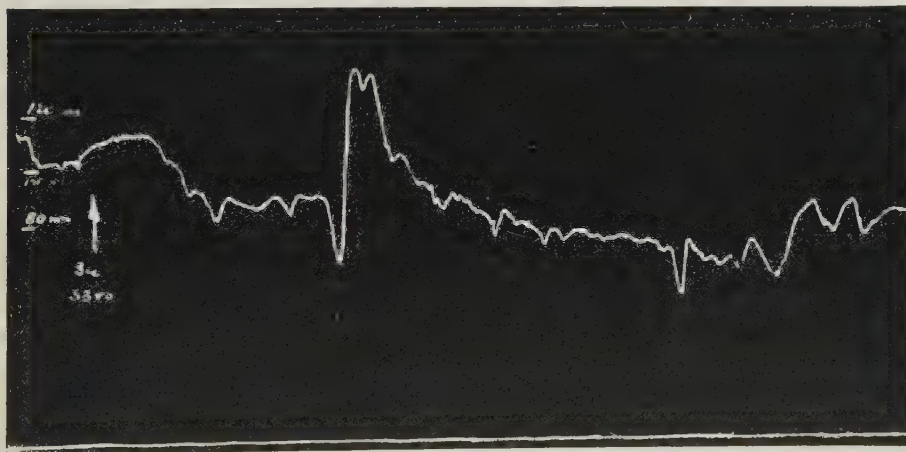


Fig. 4 — Rabbit n°. 10. Control animal. At the arrow, 3 cc of horse serum were injected. Median shock (++). Dial + urethane anesthesia.

The experiments referred to above, entirely disagree with the results described by UNGAR and col. (4,5) who have found that ascorbic acid inhibits the liberation of histamine from isolated sensitized guinea pig uterus when put in contact with the antigen, and with those describ-

ed by GIROUD & GIROUD (11) who were unable to produce severe or fatal shock in the rabbit after treatment with ascorbic acid. Our results rather agree with those obtained by SCHWARTZ & CISLOGHI (6), van NIEKERK (7), CORREIA (8), RAFFEL & MADISON (9), COHEN (10), in the guinea pig, and by EYER and col. (12) in the dog, who were unable to obtain any favorable effect of ascorbic acid upon anaphylactic shock, *in vitro* and *in vivo*.

CONCLUSIONS

Nineteen rabbits, sensitized to horse serum, have been used in this study on the effects of ascorbic acid upon anaphylactic shock. Seven animals received doses of ascorbic acid comprised between 200 mgs to 500 mgs, before the provocative injection. Six animals received the antigen without any previous treatment with ascorbic acid. Six animals were bled by heart puncture and samples of blood assayed *in vitro* for histamine liberation.

Ascorbic acid had no effect either upon the intensity of the shock or upon the reduction of the histamine content of the blood, after injection of the antigen.

Ascorbic acid when carefully neutralized does not release histamine from cells to plasma, when added to samples of rabbits blood. Added to samples of sensitized rabbits blood, immediately before the addition of the antigen, ascorbic acid did not prevent the diffusion of histamine from cells to plasma, in experiments of *in vitro* anaphylaxis.

REFERENCES

1. HOCHWALD, A., 1935/36, Anapnylaktischer Shock und Vitamin C. Z. *ges. exp. Med.*, 97: 433 (1935); 98: 578 (1936).
2. LEMKE, C. H., 1936, Beeinflussung des anaphylaktischen Shocks der Meerschweinchen durch Vitamin C. *Monatschr. Kinderheilk*, 67:244.
3. SOLOMONICA, B., 1937, Vitamin C and anaphylactic shock. *J. Immunol.*, 31: 209.
4. UNGAR, G., PARROT, J. L. & LEVILLAIN, A., 1937, Action inhibitrice de l'acide ascorbique sur le choc anaphylactique des organs isolés. *C. R. Soc. Biol., Paris.*, 125: 1015.
5. UNGAR, G. & PARROT, J. L., 1936, Recherches sur le choc anaphylactique *in vitro*, mise en liberté d'une substance active par le poumon isolé du cobaye. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 123: 676.
6. SCHWARTZ, E. & CISLOGHI, F., 1935, Ricerche sperimentali su alcune azioni biologiche dell'acido ascorbico; su di una presunte azione dell'acido ascorbico sullo shock anafilatico. *Minerva Medica*, 2: 522.
7. van NIEKERK, J., 1937, Anaphylaxis and Vitamin C. *J. Allergy*, 8: 446.
8. CORREIA, P. 1942, Vitamina C e anafilaxia, *Rev. Med.*, S. Paulo, 26: 53.
9. RAFFEL, S. & MADISON, R. R., 1938, The influence of ascorbic acid on anaphylaxis in guinea pig. *J. Infect. Dis.*, 63: 71-76 .
10. COHEN, M. B., 1938, Vitamin deficiency: sensitivity to neoarsphenamine and anaphylactic shock, *J. Allergy*, 10:15.
11. GIROUD, P. & GIROUD, A., 1936, Pouvoir protecteur de l'acide ascorbique sur les accidents mortels de la sero-anaphylaxie du lapin, *C. R. Soc. Biol., Paris*, 121:1588.
12. EYER, S. M., DRAGSTEDT, C. A. & ARELLANO, M. R., 1938, Vitamin C and anaphylactic shock in dogs, *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 38:642.
13. WALZER, M., 1938, A critical review of the recent literature on the dust atopen and on Vitamin C in relation to hypersensitiveness. *J. Allergy*, 10:72.
14. ROSE, B. & WEIL, P., 1939, Blood histamine in the rabbit during anaphylactic shock. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 42:494.
15. KATZ, G., 1940, Histamine release from blood cells in anaphylaxis in vitro. *Science*, 91: 221.
16. DRAGSTEDT, C. A., ARELLANO, M. R., LAWTON, A. H. & YOUMANS, G. P., 1940, Passive sensitization of rabbits blood, *J. Immunol.*, 39: 537.
17. ROSE, B. & BROWNE, J. S. L., 1941, Studies on the release of histamine from the blood cells of the rabbit, *J. Immunol.*, 41:403.
18. CODE, C. F., 1934, The quantitative estimation of histamine in the blood, *J. Physiol.*, 89: 257.
19. ROCHA e SILVA, M. 1940, Anaphylaxis in the rabbit. The symptom of fall of blood pressure. *J. Immunol.*, 38: 333.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 45-47
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

DUAS NOVAS ESPÉCIES DO GÊNERO "TETANO-RHYNCHUS" (Orthoptera, Proscopiidae) [1]

S. DE TOLEDO PIZA JOR.

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo

(Com 5 figuras no texto)

Tetanorhynchus mendesi n. sp.
(Figs. 1-4)

Feminae : Longitudo 95 mm. 88 91 92 103 100 95 102 100 103. Caput 19,5 mm. 18 20 20 20,5 20 20,8 20 21 21. Fastigium 9 mm. 8,5 10 10 10 10 10,5 9 10,5 10,8. Pronotum 17,5 mm. 17 18,2 18 18,5 17,5 18,5 18,5 19 19,3. Femora ant. 13 mm. 11,5 12 13 13,5 13 12,8 13,5 13,5 14. Femora post. 30 mm. 28,2 29,5 30,5 33 31,5 29 ? 32,3 31,5. Tibiae post. 34,5 mm. 30,2 30,5 33,5 33 32,5 31 ? 34,5 31,5.

Mares : Longitudo 68,8 mm. 63,5 60 66,5 61 65 60,5. Caput 14,5 mm. 13,5 12,3 13 12,5 12,8 12,5. Fastigium 6,5 mm. 6,5 6 6 5,5 6,5 6,5. Pronotum 13 mm. 12,5 12,2 13,5 11,5 13 13. Femora ant. 9,5 mm. 9,5 9,1 10,2 9,5 10 8,8. Femora post. 22 mm. 22 20,6 22,2 20,5 22 22. Tibiae post. 22,5 mm. 22,5 21,5 24 20,5 22,5 22,5.

♀ — Caput rectum seu modicissime arcuatum, in medio levissime longitudinaliter carinulatum vel sulcatum, rugulosum, puncturatum. Fastigium quam pars reliqua captis tam longum vel brevius, apicem versus sensim attenuatum, base convexum, apice concavum, marginibus paulo productis, ad extremitatem apicalem X ramis superioribus divergentioribus designantibus. Antennae trientem apicalem fastigii attingentes, articulo basilari dimidium majoris oculorum axis haud superante.

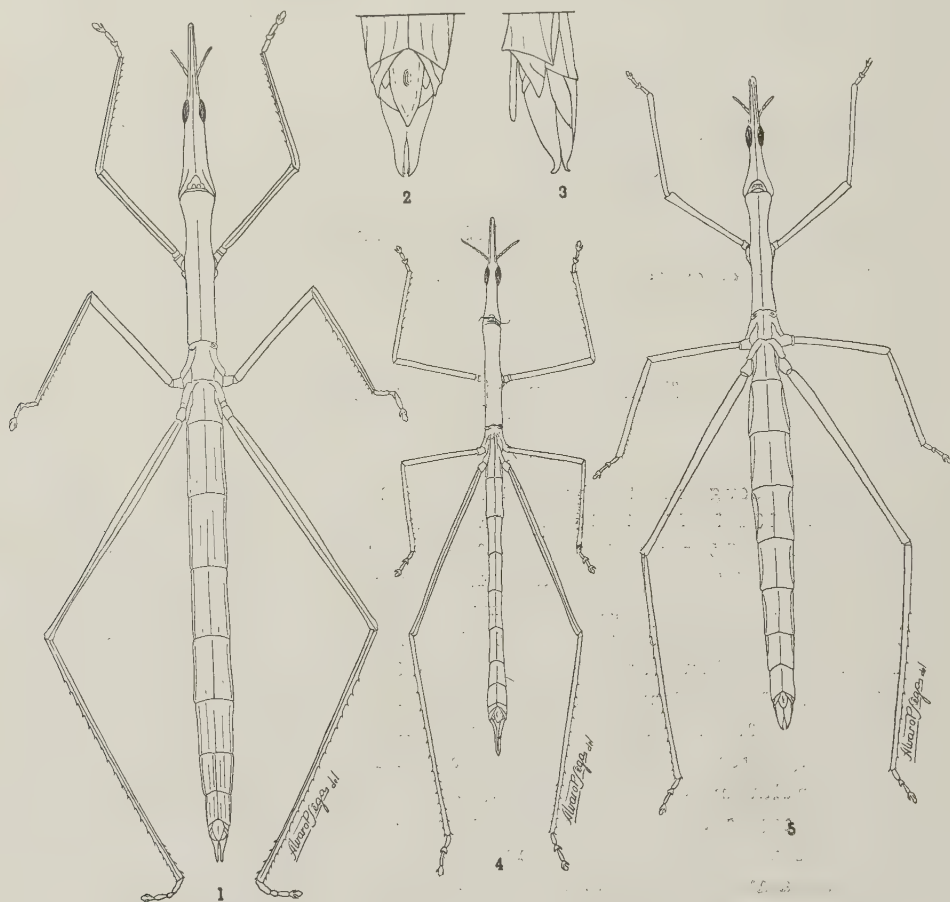
Prothorax cylindricus, dense punctatus, punctis a granulis semilunaribus marginatis. Pronotum capite brevius a prosterno vix divisum, carina mediana indistincta seu vix notata. Prosternum profunde longitudinaliter sulcatum. Mesonotum atque metanotum cum segmento mediano dense punctato-granulata, indistincte carinulata. Segmentum medianum a metanoto distincte sectum. Abdomen — segmenta anteriora precipue — saepe dense punctato-granulatum carina mediana a sulco lineari signata, pro carinulis lineis duabus vix notatis utrinque praeditum, inferne creber punctatum, in medio longitudinaliter carinulatum vel angustissime sulcatum, segmento ultimo nec carinulato nec sulcato. Lamina supra-analis lanceolata, puncturata, fovea dorsalis sat longa, apice

---

1 Recebido para publicação a 14 de Dezembro de 1942.

acuminato vel rotundato. Margo valvarum superiorum ovipositoris usque ad tertiam partem apicalem modice declivis.

Femora postica tibiis vix breviora, raro aequilonga, ad basin paulo incrassata, superne carinis duabus appropinquatis, ad apicem spinis duabus minutis armata. Tibiae rectae, multi-spinulosae.



Tetanorhynchus mendesi n. sp. — Fig. 1: ♀; fig. 2: extremidade do abdômen vista por cima para mostrar a lâmina supra-anal; fig. 3: extremidade do abdômen mostrando a forma das valvas do ovipositor; fig. 4: ♂. Fig. 5: *Tetanorhynchus simillimus* n. sp., ♀.

Virescens, castanea vel lutescens, fastigio violaceo, thorace plerumque vitta clara plus minusve distincta utrinque ornato, prosterno nigro-maculato, abdomine partim nigricanti.

♂ — Oculi plus minusve prominentes. Antennae fastigio breviores, articulo basilari dimidio oculorum breviore. Pronotum rugulosum, dense puncturatum atque obsolete granulatum. Abdomen creber puncturatum, granulis obsoletis. Lamina subgenitalis elongata, puncturata, acuminata, superne canaliculata, apice bipartita, inferne recte carinata, fastigio minore.

Vario virescens, vittis lateralibus prothoracis luteis quam feminae evidentioribus.

Patria — S. Paulo (Capital), Campinas, Piracicaba.
Tipos — 10 ♀♀ e 11 ♂♂.
Espécie muito comum. Além dos tipos examinei mais 8 ♀♀ e 12 ♂♂ das mesmas procedências.

O nome da espécie é dado em homenagem ao Dr. LUIZ OCTAVIO TEIXEIRA MENDES, do Instituto Agrnômico de Campinas, atualmente no Instituto Agronômico do Pará, que cedeu-me o material para estudo.

Tetanorhynchus simillimus n. sp.
(Fig. 5)

Feminae : Longitudo 89,5 mm. 87 89,5 89 79,5 85 87 95. Caput 17,5 mm. 15 16,2 17,3 14 15 17 17. Fastigium 7,5 mm. 7 7,3 8 6,5 6,5 8 8. Pronotum 18,5 mm. 17 18,2 17,8 15 17 16,5 18. Femora ant. 13 mm. 12 12 12 11 12,2 12,7 12,7. Femora post. 29,5 mm. 26,2 ? 28 25,2 26,8 29,5 28,5. Tibiae post. 31 mm. 28,3 ? 30 28 31 31 30,5.
♀ — Speciei precedenti simillima differt capite pronoto evidenter breviore, prothorace magis cylindrico, pronoto a prosterno indistincte secto, lamina supra-anali apice vix obtusiore.
Patria — Marilia, E. de S. Paulo.
Tipos — 8 ♀♀.

Qualquer dessas duas espécies poderia ser considerada como uma simples variedade geográfica da outra. Entretanto, como não possuimos nenhum critério para decidir do verdadeiro valor sistemático dos grupos aquí descritos, achamos melhor, apesar-da sua grande afinidade, considerá-los como espécies distintas.

RESUMO

São descritas duas novas espécies de *Proscopiidae* do gênero *Tetanorhynchus*: *T. mendesi* n. sp. e *T. simillimus* n. sp. Com estas elevam-se a 16 as espécies conhecidas do gênero.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 49-66
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

RECHERCHES SUR L'ATTAQUE ÉPILEPTIFORME PRODUITE PAR LE REFROIDISSEMENT BRUSQUE DE LA MOELLE ÉPINIÈRE (CRYOÉPILEPSIE)

Mémoire cinquième — Étude des différentes formes de l'attaque chez les Grenouilles de différents pays. Influence de l'espèce, du climat et des conditions ambientes [1]

MIGUEL OZORIO DE ALMEIDA, H. MOUSSATCHÉ et M. VIANNA DIAS

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Avec 13 figures)

Dans les mémoires antérieures (14, 15, 16, 17), publiés dans cette même revue, nous avons fait un exposé d'ensemble des résultats des observations et des expériences sur l'attaque de cryoépilepsie chez le *Leptodactylus ocellatus* des environs de Rio de Janeiro. Dans les mémoires qui suivront nous développerons cette étude. Cependant, il nous semble utile et même nécessaire de réunir dès maintenant les données sur le phénomène observé sur d'autres espèces de Grenouilles, ou sur la même espèce habitant dans des climats différents ou ayant des conditions différentes de vie.

Cette étude est encore forcément très incomplète. Les donnés furent cueillies dans des voyages parfois rapides et, plus d'une fois, nous fumes obligés de nous contenter de quelques expériences. D'autre part, le développement des recherches faites à Rio de Janeiro nous a montré que certains éléments dont on ne tenait pas compte dans les prémières études, sont très importants pour l'interprétation des résultats. A l'époque de plusiers des recherches ici rassemblées, nous n'étions pas encore arrivés à certains de ces résultats et la question ne se posait pas de soumettre les phénoménes étudiés, souvent dans des conditions insuffisantes, à une analyse qui exigerait beaucoup plus de temps.

[1] Reçu le 28 Décembre 1942.

Il nous serait impossible de faire nous-même l'étude des caractères de l'attaque épileptiforme dans tous les pays. Nous espérons que la publication de ces premiers résultats, dont plusieurs sont inédits et d'autres se trouvent éparpillés dans des notes isolées, pourra éveiller l'interêt d'autres physiologistes de plusieurs pays, qui voudront bien répéter ces expériences et décrire les caractères spécifiques et locaux des phénomènes.

I. L'Attaque épileptiforme chez le Leptodactylus ocellatus de plusieurs régions différentes

1. *Expériences faites à Recife (Pernambouc)* (7) — Les caractéristiques essentielles du climat de Recife sont les suivantes. Température moyenne de l'année : 26°,5. Il n'y a que deux saisons, l'une sèche de Septembre à Fêvrier et l'autre humide de Mars à Août. Nos expériences furent faites en Décembre et à cette époque de l'année, la température moyenne est de 27°,14. Les maxima et les minima absolues de température sont respectivement 37°,3 et 16°,3. L'humidité relative est assez élevée : 74,4. Toutes ces données se trouvent dans le memoire d'Octavio de Freitas (1). Dans d'autres périodes d'observation on a constaté des températures exceptionnelles, en dehors de ces limites : 39°,6 (Avril 1886), 11°,4 (Septembre 1885) (2).

Dès les prémières expériences, nous avons constaté que la limite supérieure de température de production de l'attaque est bien plus élevée que dans le cas des Grenouilles de Rio. Nous avons tâché de déterminer cette limite supérieure. Le tableau I nous donne les résultats des 17 expériences réalisées.

Tableau I — Détermination de la limite supérieure de température de l'attaque chez les Grenouilles Leptodactylus ocellatus **de Pernambouc**

Temp. du bain	7,5	10,4	10,6	10,7	10,9	11,4	11,5	11,5	
Période latente	1'15"	2'30"	∞	1'30"	2'45"	4'0"	1'30"	50"	
Temp. du bain	11,5	11,7	11,85	12,15	12,3	12,4	12,5	12,6	13,9
Période latente	2'45"	∞	1'30"	2'35"	∞	∞	∞	∞	∞

A Recife, donc, la limite supérieure se trouve aux environs de 12°, tandis qu'elle est à 8,5 à Rio chez la même espèce de Grenouille.

On doit remarquer que, même dans les températures élevées, très proches de la limite supérieure, la période latente fut toujours très courte. Si on la compare avec les périodes latentes des Grenouilles de Rio, on voit que, dans ce dernier cas, à des temps du même ordre de grandeur correspondent des températures beaucoup plus basses du bain réfrigérant.

Dans quelques cas, après avoir constaté que l'attaque ne se produisait pas à une température qui dépassait ainsi la limite supérieure, on refroidissait brusquement le bain : l'attaque ne manquait pas de se produire. Ainsi, dans un cas où l'attaque ne s'est pas produite à 12°,3, elle s'est montrée à 9°. Dans une autre expérience, l'attaque a manqué à 12°,6 et s'est produite à 7°,8.

Nous avons obtenu aussi des attaques réflexes dans les cas où la température du bain dépassait la limite supérieure. Dans l'expérience XV, cette attaque réflexe s'est produite à 13°,5.

La forme de l'attaque est, d'une manière générale, bien différente de la forme communément observée à Rio. Elle se rapproche d'une forme d'attaque,

rare à Rio, dans laquelle il n'y a pas de séparation nette entre la phase tonique et la phase clonique (V. fig. 2 du deuxième memoire (15) de cette série). Dans la fig. 1 on voit le tracé d'une de ces attaques, produite par un jet de chlorure d'éthyle. La crise convulsive est habituellement brève. Nous avons cependant obtenu une fois une attaque qui suivait l'allure générale de celles de Rio.

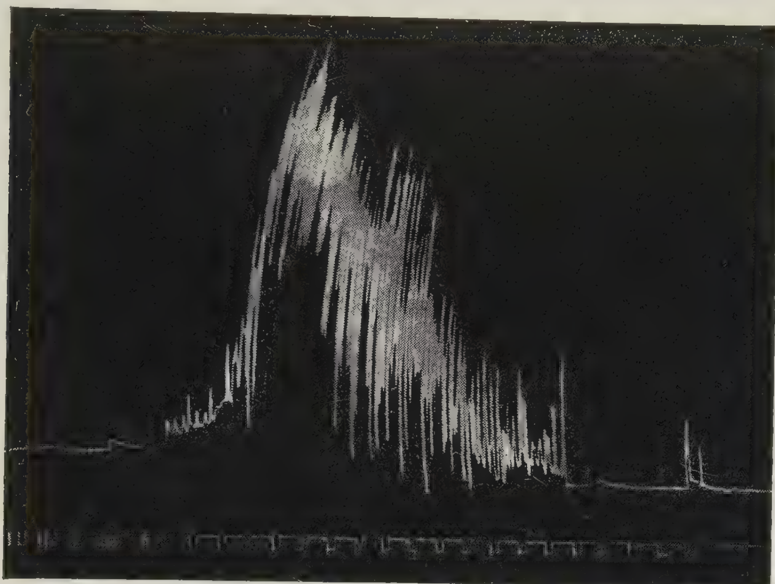


Fig. 1 — Attaque du *L. ocellatus* de Pernambouc. Temps en secondes. Refroidissement par le chlorure d'éthyle.

2. *Expériences faites à Belo Horizonte* (13) — Belo Horizonte, la capitale de l'État de Minas Gerais, est une ville bâtie sur un plateau. Les caractéristiques essentielles du climat de cette région, que nous empruntons au livre de J. Giovannini (3), peuvent être résumées comme il suit : La ville se trouve à 900 mètres au-dessus du niveau de la mer. La temperature moyenne de l'année est 20°,4; température maxima : 35°,2; température minima : 2°,4; humidité relative : 73 p. 100.

Le tableau II résume les résultats des expériences faites pour la détermination de la limite supérieure de température observée chez le *L. ocellatus*.

Tableau II — Determination de la limite supérieure chez le L. ocellatus **de Belo Horizonte**

Temp. du bain	4,6	7,5	8,0	8,0	8,3	8,5	8,7
Période latente	3'55"	1'30"	∞	∞	∞	2'10"	∞

Au-dessus de 8°, il n'y a eu qu'une attaque, d'ailleurs après une période latente assez réduite. La limite supérieure se trouve donc aux environs de 8° et, quoique assez proche, elle est légèrement plus basse que celle que l'on trouve à Rio.

En ce qui concerne la forme de l'attaque, aussi bien l'observation directe que les tracés le démontrent, elle est la même que celle donnée par les Grenouilles de Rio (fig. 2).

Dans la région de Belo Horizonte, on trouve assez facilement une autre espèce de *Leptodactylus*, le *L. pentadactylus*. Ce sont parfois des animaux superbes, dont le poids peut atteindre plusieurs centaines de grammes. La peau est très épaisse et, dans la préparation moelle isolée-train postérieur, les réflexes se

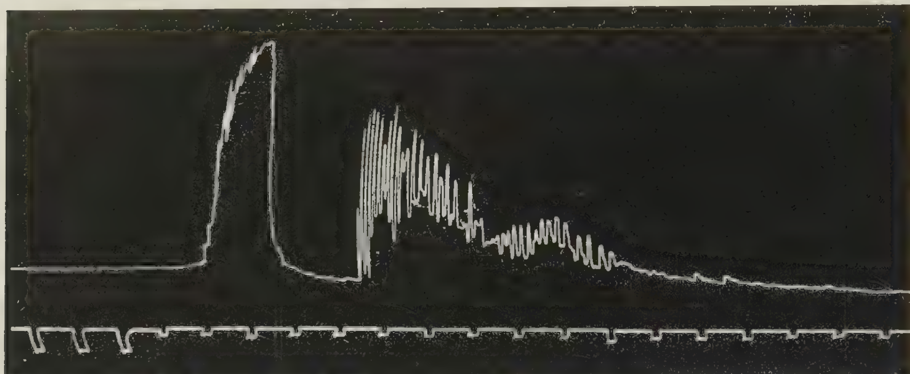


Fig 2 — Attaque du *L. ocellatus* de Belo Horizonte. Temps en secondes. Refroidissement dans un bain de Ringer à 3°,7.

montrent avec une intensité réduite; les réactions sont lentes. Le réflexe du saut (12), d'ordinaire si net chez le *L. ocellatus*, n'existe pas ou se présente très affaibli. Le tonus de Brondgeest était presque imperceptible, surtout dans le cas des gros exemplaires. Il se peut que le poids des membres soit la cause de cette réduction apparente du tonus (10).

La limite supérieure de l'attaque chez le *L. pentadactylus* est de beaucoup plus élevée que dans le cas des *L. ocellatus* de la même région. Nous ne pouvions pas le déterminer d'une manière très précise, étant donné que le nombre de spéciments dont nous disposions était réduit. Le tableau III résume les données expérimentales.

Tableau III — Détermination de la limite supérieure de température chez le L. pentadactylus

Poids de l'animal	46	31	300	224	22	25
Temp, du bain	6,4	8,9	9,2	9,9	12,0	13,8
Période latente	1'35"	1'20"	2'20"	5' 0"	3'40"	∞

Comme on le voit, l'attaque s'est produite jusqu'à 12° et a manqué à 13°,8. Entre ces deux températures il n'y a pas eu de détermination. On peut donc penser que la limite supérieure se trouve à 12° et peut-être un peu au-dessus.

Quant à la forme, l'attaque chez le *L. pentadactylus* présente certains aspects particuliers. La phase des tremblements fibrillaires et la phase tonique sont assez semblables à ce que nous avons décrit pour le cas des Grenouilles de Rio. La phase clonique, cependant, suit la phase tonique sans intervalle entre les deux. Dans plusieurs cas, les convulsions cloniques sont constituées par des secousses qui partent déjà d'un dégré assez marqué de contraction soutenue. En d'autres termes, pendant la phase clonique, il y a une composante tonique assez marqué. Dans quelques cas, cette composante tonique décroît progressivement et les contractions cloniques suivent une ligne descendante. Parfois, cette composante tonique est nulle ou très réduite et l'allure générale de l'attaque est semblable à celle de Rio.

On observe, chez le *L. pentadactylus,* une période de convulsions cloniques qui recommencent quelque temps après la cessation de l'attaque et qui peuvent ressembler à la *quatrième phase* observée chez les Grenouilles de Rio (15). Cette quatrième phase peut ne pas se montrer en même temps d'un et d'autre côté. Dans une des expériences, une fois arrivée cette période, les muscles d'un côté du corps présentaient des convulsions, tandis que ceux de l'autre côté étaient au repos. Quand les convulsions céssèrent d'un côté, les muscles de l'autre ont commencé les contractions rythmiques. En dehors de cette quatrième phase, la plupart des fois, dans cette espèce l'attaque recommence et reprend d'intensité à la fin de la phase clonique. On peut même avoir une sorte de deuxième attaque, clonique et tonique, d'un type semblable à celui des Grenouilles de Pernambouc (fig. 3).

3. *Expériences faites à São Paulo* — Les données essentielles sur le climat de São Paulo peuvent être résumées comme il suit : température moyenne : 17,6; température maxima : 34,4; température minima : —2°,0; humidité relative : 79,1.

Le tableau IV contient le résumé des déterminations de la limite supérieure faites à São Paulo sur le *L. ocellatus.*

Tableau IV — Détermination de la limite supérieure chez le L. ocellatus **à São Paulo**

Temp. du bain	6,0	6,4	7,0	7,0	7,0	7,2	7,5	8,0	8,5
Periode latente	6',0	2'10"	2'30"	∞	∞	∞	1'59"	2'30"	∞

Malgré le petit nombre des déterminations, on peut admettre que la limite supérieure se trouve aux environs de 7°,0 ou un peu au-dessus. Elle est donc déjà plus basse que celle de Rio. Dans les expériences où l'attaque a manqué, on a pu produire des attaques réflexes dans des temperatures au-dessus de la limite supérieure.

La forme de l'attaque n'est pas très constante. Dans quelques cas, elle est tout-à-fait analogue à celle de Rio. Dans d'autres cas, il y a une fusion des deux phases — tonique et clonique — et l'attaque est très forte (fig. 4).

4. *Expériences faites à Montévidéo* (*Leptodactylus ocellatus*) (7) — Le climat de Montévidéo est caractérisé par une température moyenne de 16°,3; température maxima : 39,3; température minima : —4,8.

Les expériences faites pour la détermination de la limite supérieure de température ne furent pas très nombreuses, mais leur résultat est assez net. Le tableau V en résume les données essentielles.

Tableau V — Détermination de la limite supérieure chez le L. ocellatus **de Montevidéo**

Temp. du bain	4,5	5,0	5,0	5,1	5,3	5,7
Période latente	2'15"	∞	∞	5'15"	∞	2'15"

Dans l'expérience III, la moelle fut placée après dans un bain refroidi à 1°,5 et l'attaque s'est produite.

La limite supérieure de l'attaque chez le *L. ocellatus* de la région de Montévidéo est donc nettement plus basse que celle observée à Rio et, à plus forte raison à Pernambouc. Elle se trouve un peu au-dessus de 5°.

La forme de l'attaque présente des différences quand on la compare à l'attaque des Grenouilles de Rio. Elle se rapproche beaucoup de celle des Grenouilles de Pernambouc. Une fois commencés, les tremblements se montrent de plus

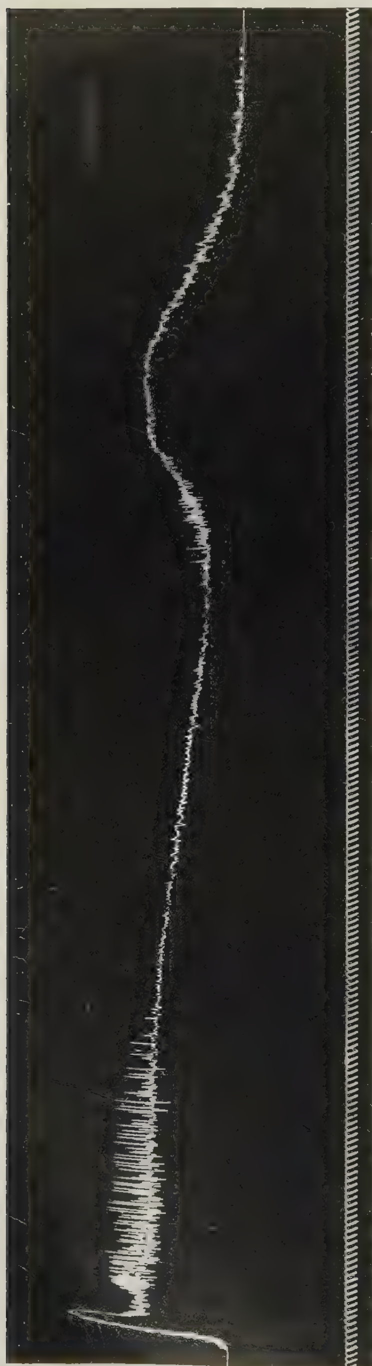


Fig. 3 — Attaque chez le *L. pentadactylus* de Belo Horizonte. Refroidissement par le chlorure d'éthyle. Temps en secondes.



Fig. 4 — Attaque chez le *L. ocellatus* de São Paulo. Refroidissement par le chlorure d'éthyle. Temps en secondes.

en plus intenses et la phase clonique survient en même temps qu'une contraction tonique qui passe par un maximum et redescend vers le zéro. Il n'y a pas de phase tonique pure et l'on observe toujours des contractions cloniques superposées (figs. 5 et 6).



Fig. 5 — Attaque donnée par le *L. ocellatus* de Montevidéo. Temps de 5 en 5 secondes. Refroidissement dans un bains de Ringer à 3°,5.

En rentrant à Rio de Janeiro, nous avons apporté des Grenouilles de Montévidéo. Installées dans l'aquarium de notre laboratoire elles ont servi à des ex-

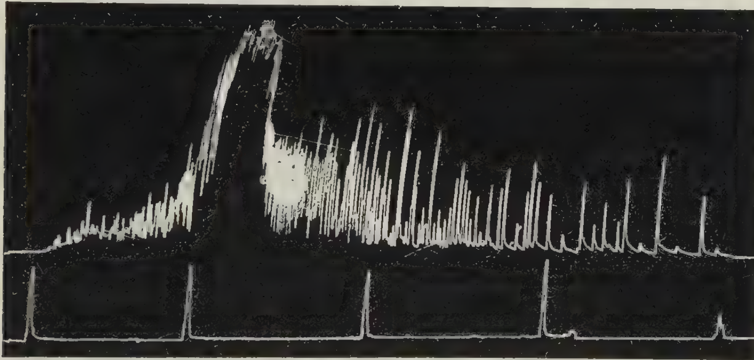


Fig. 6 — Attaque chez une grenouille de Montevidéo (*L. ocellatus*). Temps de 10 en 10 secondes. Refroidissement dans un bain de Ringer à 1°,5.

périences qui ont montré une très rapide modification de la forme de l'attaque. Après quelques jours, celle-ci a pris une forme presque entièrement semblable à celle que l'on trouve chez les Grenouilles de Rio. La figure 7 nous montre une attaque donnée par une Grenouille uruguayenne, après un séjour de six jours dans notre aquarium. Dans d'autres cas, la transformation ne fut pas aussi complète, mais l'attaque s'est montrée déjà assez différente de celles que nous avions observées à Montévidéo.

5. *Expériences faites à Buenos-Aires* (*Leptodactylus ocellatus*) — La température à Buenos-Aires est très proche de celle de Montévidéo : moyenne: 16,6; maxima : 39,5; minima : —5,0.

Le tableau VI résume les données des expériences faites pour la détermination de la limite supérieure.

Tableau VI — Détermination de la limite supérieure chez le L. ocellatus de Buenos-Aires

Temp. du bain	5,1	5,2	5,3	5,3	5,4	5,4	6,2	6,5	6,7	7,0
Période latente	6'0"	5'30"	∞	∞	∞	∞	∞	3'40"	∞	6'15"

Dans plusieurs des expériences négatives, après avoir constaté que l'attaque ne se produisait pas, on a provoqué des attaques réflexes par des excitations mécaniques des pattes. La limite supérieure n'est pas très claire dans ces expériences. Au-dessus de 5°,2, presque toutes les expériences furent négatives. Il y a eu une attaque à 6,5 et une autre à 7. On observe, en effect, toujours des variations individuelles, comme nous l'avons constaté pour le cas de Rio. La limite moyenne se trouve donc un peu au-dessus de 5°. Dans l'expérience 6, n'ayant pas obtenu l'attaque à 5°,4, on l'a vu se produire très forte après un nouveau refroidissement à 2°.



Fig 7 — Attaque donné par un *L. ocellatus* de Montevidéo transporté à Rio, après 6 jours de sejour dans l'aquarium du laboratoire. Temps en secondes.

À Buenos-Aires, la forme de l'attaque se rapproche de celle de Rio, mais la période clonique finale présente toujours une composante tonique, c'est-à-dire, les contractions cloniques ne se font pas en partant de la ligne de zéro du myographe, mais déjà d'une certaine hauteur (fig. 8).

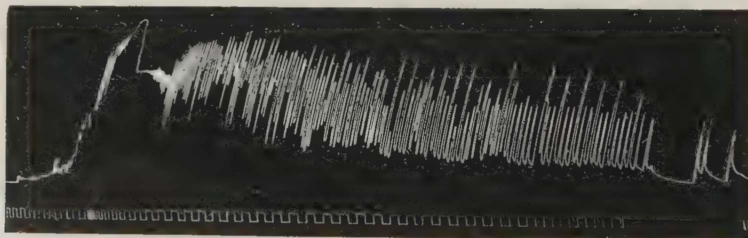


Fig. 8 — Attaque donnée par un *L. ocellatus* de Buenos Aires. Temps en secondes. Refroidissement dans un bain de Ringer à 2°.

6. *Expériences sur le L. ocellatus faites à Rosario de Santa Fé (Argentine)* — Données essentielles du climat : Température moyenne: 17,2; température maxima : 44,0; température minima : —7,8.

À Rosario de Santa Fé, nous sommes restés une seule journée. Les *Leptodactylus ocellatus* de la région donnent bien ds attaques par le refroidissement de la moelle isolée, mais le phénomène n'a pas la même intensité que dans les autres régions étudiées. Nous avons constaté l'existance du phénomène dans

des températures proches de 0°. Notre collègue et ami le Prof. J. T. LEWIS a eu ensuite la bonté de faire une série d'expériences sur la période latente en fonction de la température du bain. Les résultats obtenus par lui se trouvent dans le tableau VII.

Tableau VII — Période latente en fonction de la température du bain — L. ocellatus de Rosario de Santa Fé

Temp. du bain	1,0	1,4	2,1	2,2	3,2	3,4	4,2	4,2	
Période latente	50"	1'10"	1'15"	1'40"	1'50"	1'50"	2'45"	2'50"	
Temp. du bain	3'50"	4',0	3'35"	3'50"	4'30"	∞	∞	∞	∞
Période latente	5,0	5,3	6,0	6,1	7,0	8,5	8,5	9,0	10,0

Ces expériences démontrent que, chez les Grenouilles de la région, la période latent croît aussi avec la température du bain réfrigerant. Il n'y a pas eu assez de déterminations pour connaître exactement la limite supérieure, mais on peut admettre qu'elle se trouve un peu au-dessus de 7°. Nous ne possédons pas des tracés de l'attaque. Étant donnée l'intensité réduite du phénomène, elles sont difficiles à prendre.

II. L'ATTAQUE ÉPILEPTIFORME CHEZ LES GRENOUILLES DU GENRE *Rana*

1. *Expériences faites en Europe avec les Grenouilles européennes* — En 1937, au laboratoire dirigé par le Prof. CARLO FOÀ à Milan et, ensuite, au laboratoire de la Sorbonne à Paris, dirigé par le Prof. H. PIÉRON, l'un de nous a fait des séries d'expériences sur les Grenouilles européennes (*R. fusca, R. viridis* et aussi les grosses Grenouilles hongroises). À cette époque nous ne disposions que de la technique du bain refroidi et ainsi les expériences ne pouvaient être faites que jusqu'à des températures allant jusqu'à quelques dixièmes de dégré au-dessous de 0°C., cest-à-dire, la température de congélation du liquide de Ringer.

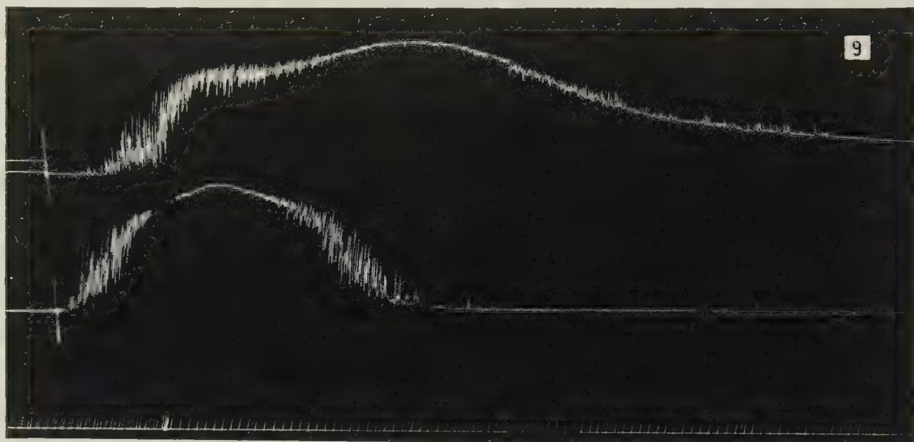
Dans aucune expérience, le refroidissement de la moelle jusqu'à 0° n'a produit d'attaque épileptiforme. La plupart des fois, il n'y avait aucune réaction. Dans quelques cas, on constatait quelques secousses isolées, qui ne dépassaient jamais une certaine intensité. On a tenté l'action d'un refroidissement ou d'un échauffement préalables de la moelle, mais, en dehors de certaines variations dans l'intensité des réactions cloniques isolées, aucune attaque ne s'est produite (6).

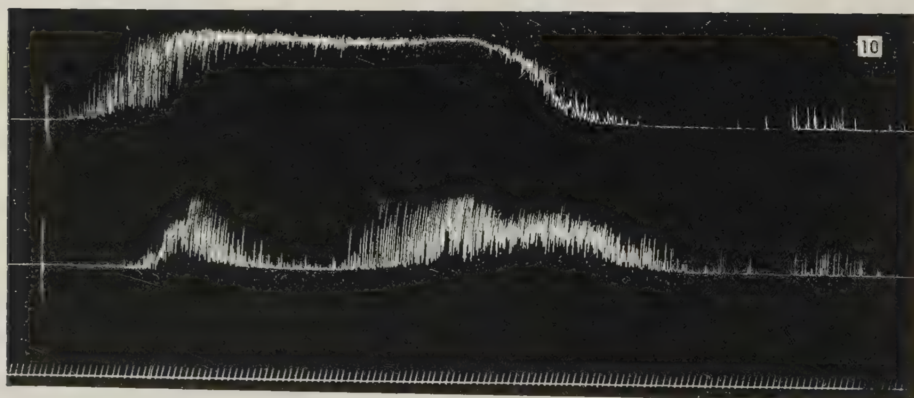
Après avoir mis au point des techniques de refroidissement à des températures inférieures à 0°C., nous avons, en 1939, repris la question à Paris. L'attaque est obtenue avec une constance absolue si l'on refroidit la moelle par un jet de chlorure d'éthyle appliqué sur la colonne vertébrale isolée, ce qui permet d'obtenir un refroidissement à plusieurs dégrés au-dessous de 0° (8).

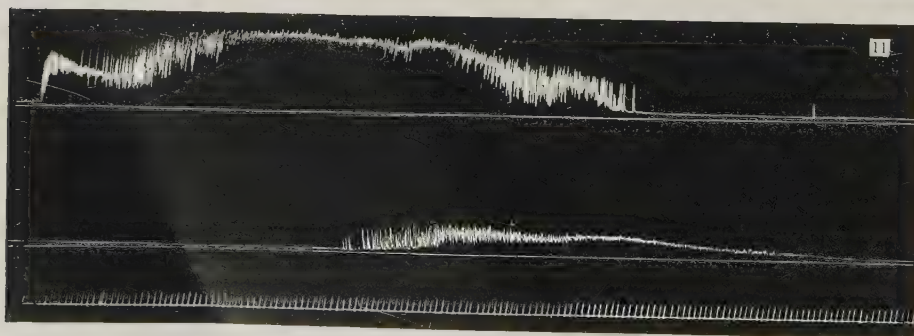
L'attaque présente alors des caractères très différents de celles des attaques observées chez le *L. ocellatus*. On ne peut pas parler d'une période latente comme un élément d'analyse, quand on emploie la technique du chlorure d'éthyle. Mais, nous pouvons dire qu'elle fut toujours très longue, surtout si on tient compte des dimensions de la préparation, toujours plus petite en Europe. L'attaque commence par des tremblements et des contractions cloniques; cette phase peut durer assez longtemps avant de passer à la période tonique. Celle-ci est assez prolongée et, finalement, on observe de nouvelles contractions cloniques, à rythme de plus en plus lent. Dans les conditions techniques adoptées, il était impossible de savoir à quelle température se produisait l'attaque. Ce doit être une température assez basse : la colonne vertébrale se trouvait presque toujours congélée après l'application du chlorure d'éthyle, qui devait être très prolongée. Aussi, la plupart des fois, les réflexes ne revennaient plus quand

on ramenait la moelle à la température du laboratoire. Dans une expérience, cependant, on a pu obtenir quelques réflexes après l'attaque.

Au contraire de ce que l'on observe à Rio, dans l'attaque de la Grenouille européenne, rarement les réactions des deux côtés sont symétriques et simultanées. Le début de l'attaque se montre à des moments différents d'un côté et de l'autre. On peut même observer deux sortes différents de décalage : l'un,







Figs. 9-11 — Trois types différents d'attaque donnée par les grenouilles européennes (Paris). Refroidissement par le chlorure d'éthyle. Temps en secondes.

petit, de quelques secondes (figs. 9 et 10) et le deuxième beaucoup plus grand (fig. 11). Ce deuxième décalage est observé quand l'attaque se produit en deux phases nettement séparée et que la prémière phase manque dans une des pattes. Le petit décalage est beaucoup plus fréquent.

En général, l'attaque est très prolongée et présente de grandes variations de forme (figs. 9, 10, 11). Il est même difficile de trouver deux attaques semblables. En dehors du type ci-dessus décrit, nous donnerons quelques autres comme éxemples. Après une brève période de tremblements, l'attaque peut commencer par des convulsions cloniques avec une composante tonique. L'amplitude des secousses va en diminuant, tandis que la hauteur de la contraction tonique augmente. Ensuite, à mesure que la contration soutenue se réduit, les oscillations cloniques reprennet leur amplitude initiale. D'autres fois, la composante tonique se maintient à un même niveau inaltérable et, cependant, les contractions cloniques tendent à se fondre dans une sorte de contraction tétanique. Enfin, dans quelques cas, l'attaque est presque exclusivement bornée à une série de contractions cloniques, dans lesquelles l'intervention d'un élément tonique est réduite à un minimum.

Nous avons aussi fait quelques expériences à l'Institute Rocha Cabral à Lisbonne. L'attaque ne se produit pas au-dessus de 0°. La forme de l'attaque produite par le jet de chlorure d'éthyle, donc au dessous de 0°, est différente de celle de Paris. Nos expériences furent peu nombreuses et en général, l'attaque est formée par des contractions cloniques avec une composante tonique qui augmente, passe par un maximum et se réduit ensuite.

2. *Expériences faites avec les Grenouilles de Cuba* — Les données qui nous intéressent sur le climat de La Habana sont les suivantes : Température moyenne : 24,8. Moyenne des maxima : 36,2. Moyenne des minima : 11,8 (4).

Nous n'avons pas obtenu des *Leptodactylus* à La Habana. Nos expériences furent faites sur une espèce de *Hyla* (?). Les spécimens étaient de très petite taille. L'attaque est, en général, clonique avec une composante tonique plus ou moins marqué, suivant les cas, mais, au contraire de ce que l'on a observé chez les autres espèces examinées, se faisant en flexion.

Dans le tableau VIII, nous donnons les valeurs des périodes latentes observées rapportées aux températures du bain réfrigérant.

Tableau VIII — Période latente en fonction de la température du bain. Hyla **de La Habana**

Temp. du bain	0,6	1,0	1,6	3,5	4,5	6,0
Période latente	0,'20"	0,'15"	0,'30"	3',5"	0,'25"	0,'40"
Temp. du bain	7,0	7,0	7,0	8,5	8,5	
Période latente	0,'50"	1'15"	∞	∞	∞	

La limite supérieure que, par ces données, ne peut pas être connûe d'une manière précise, se trouve aux environs de 7 à 8°.

3. *Expériences faites avec les Grenouilles américaines* — A) *Rana pipiens* — Les prémieres expériences (11) furent faites avec des exemplaires importés à Rio, grâce à l'obligeance du Dr. Fred. Soper. Les Grenouilles se présentaient avec un aspect normal et se montraient très vivaces. L'attaque ne s'est jamais produite à des températures au-dessus du point de congélation de l'eau. Les Grenouilles se comportaient exactement comme les Grenouilles européennes dans les mêmes conditions, avec les mêmes modifications des réflexes. En employant la technique du refroidissement par le jet de chlorure d'éthyle sur la colonne vertébrale isolée, on a toujours obtenu l'attaque, seulement clonique, sans la

phase tonique. L'attaque elle-même est précédée par une longue période de tremblements fibrillaires et de secousses isolées, dont la durée peut dépasser une minute. La phase clonique a, en général, une durée beaucoup plus grande que celle de l'attaque du *L. ocellatus*. Dans la fig. 12 nous reproduisons un tracé de l'attaque en choisissant une des plus brève et en coupant une bonne partie de la période initiale des secousses isolées. Dans la plupart des cas, une fois l'attaque finie, en ramenant la moelle à la température ambiante, les réflexes ne sont plus revenus. Cela indique que, pour obtenir l'attaque, il faut que la moelle arrive à une température assez basse, qui détruit ses fonctions et son activité normale.

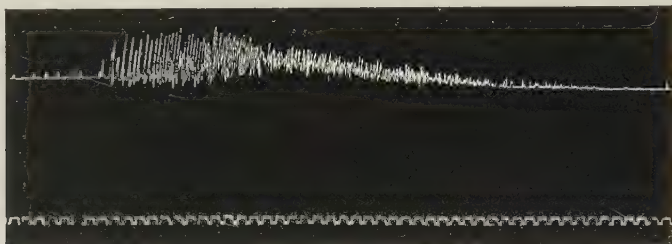


Fig. 12 — Attaque produite chez une *R. pipiens*, à Rio de Janeiro. Application de chlorure d'éthyle. Temps en secondes.

En profitant d'un long séjour à Yale University (New Haven), l'un de nous a pu reprendre l'étude de l'attaque chez les Grenouilles américaines. Nous serons très brefs dans l'exposé de ces résultats qui font l'objet d'une publication à part (9).

L'attaque ne se produit pas à des températures au-dessus du point de congélation. Il y a eu une seule exception : une attaque s'est produite à 0,5 après une période latente de 7'30''. Au-dessus de 0°C., il était même impossible de produire des attaques réflexes. Les excitations des pattes produisaient des tremblements ou des contractions cloniques, sans arriver à donner une attaque.

L'attaque se produit, cependant, à 0° ou 0°,5, si la moelle épinière se trouve exposée par l'ouverture préalable du canal vertébral. Mais, même dans ces conditions, la période latente est très grande, de 1 à 3 minutes.

Comme toujours, l'attaque commence par des tremblements; il y a ensuite une phase de contractions cloniques simples et, enfin, une phase de contractions cloniques avec une composante tonique. L'attaque peut durer jusqu'à quatre minutes. En général, elle est asymétrique.

L'attaque produite par l'application d'éther ou de chlorure d'éthyle est semblable à celle que nos avons observé à Rio de Janeiro donnée par des Grenouilles américaines.

Des attaques d'une extreme intensité sont obtenues par l'application sur la colonne vertébrale fermée, de la glace sèche. L'attaque commence après quelques secondes à peine et, après des contractions cloniques passe à une période de contractions toniques de la plus grande intensité.

B) *Rana catesbeiana* — Les expériences faites à New Haven (9), avec des spécimens dont le poids a varié de 300 à 500 grs., ont montré que l'attaque ne se produit pas à des températures au-dessus de 0°. Les muscles du dos étaient enlevés, afin de faciliter le refroidissement. La colonne vertébrale restait intacte. L'attaque ne s'est pas produite par l'application de l'éther. On a, cependant obtenu des attaques par l'application du chlorure d'éthyle.

Le grand intérêt des expériences sur des *R. catesbeiana,* se trouve dans le fait que, depuis quelques années, les Grenouilles de cette espèce, importées d'Amérique du Nord, sont élevées dans des pays chauds. Au Brésil, dans les environs de Rio, il y a, ànotre connaissance, deux entreprises d'élevage. On peut donc aborder le problème de l'adaptation à un climat tropical, très différent du climat du pays d'origine de ces grenouilles. C'est une question qui demandera beaucoup de temps jusqu'à ce que l'on arrive à des résultats décisifs. Mais, il faut que les faits soient enrégistrés dès le début.

En Juillet 1938, nous avons eu quelques spécimens de *R. catesbeiana* déjà nés au Brésil. Malheureusement, ils n'étaient pas nombreux. C'étaient des exemplaires très petits, pesant entre 20 et 40 grs. Il y avait donc une disproportion très grande entre la taille de ces Grenouilles et la taille des animaux adultes. Un de ces spécimens a donné une attaque très faible, avortée, sous l'action du chlorure d'éthyle, c'est-à-dire, avec un refroidissement de la moelle au-dessous de 0°. D'autres ont donné de bonnes attaques sous l'action du chlorure d'éthyle. La fig. 13 reproduit le tracé de l'une de ces attaques. Elle se rapproche beaucoup de celle des Grenouilles de Buenos Aires. Dans une expérience à —7°,5 (bain de solution de NaCl à 20 p. 100), il y a eu une attaque caractérisée par des secousses cloniques et des contractions désordonnées des muscles des pattes. Tout cela a duré près de 2 minutes. A 0° ou 1 ou 2 degrés au-dessus de 0°, il y a eu, dans quelques cas, des tremblements, quelques secousses cloniques isolées.

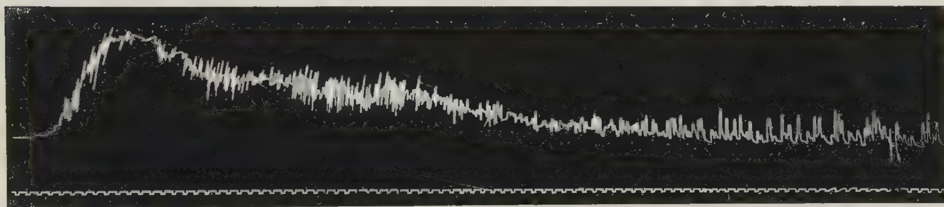


Fig. 13 — Attaque produite par un jet de chlorure d'éthyle sur un exemplaire de *R. catesbeiana,* né à Brésil. Temps en secondes.

En Février 1940, nous avons eu à notre disposition deux spécimens venus de Therezopolis. L'un pesait 41 grs. l'autre 92 grs. Le premier n'a donné à 0° que quelques tremblements, aussitôt finis. L'autre, dont la moelle fut refroidie jusqu'à —2°,3, a montré quelques tremblements, quelques secousses cloniques faibles; pas d'attaque.

En Mars 1941, quelques exemplaires, venant des environs de Rio, déjà beaucoup plus gros mais encore assez petits pour l'espèce, ont servi aus expériences. Un premier, pesant 57 grs., dont la moelle fut refroidie à 0° C., pendant 15 minutes n'a rien donné, pas même des tremblements ou des contractions cloniques. Chez les autres on a ouvert la colonne vertébrale, laissant la moelle exposée, ce qui permet d'obtenir l'attaque à plusieurs dégrés au-dessus de la limite supérieure habituelle. Dans le premier cas, le refroidissement à 0,4 a donné des secousses cloniques sans arriver à une attaque nette. Dans deux autres cas, la moelle étant exposée et le refroidissement se faisant a —0°,5 (Grenouilles de 230 grs.) l'une des préparations a donné à peine des tremblements, l'autre une attaque très faible et exclusivement clonique.

En Décembre 1941, on a répété les expériences avec des Grenouilles *catesbeiana* de la même origine. À 2°,0 et 2°,8, il n'y a eu que des tremblements. Entre 0° et —1°,0, quelques exemplaires ne donnaient que des tremblements et

des secousses cloniques. Dans quelques cas, cependant, on a observé déjà des attaques, dont une seulement bien caracterisée, d'intensité moyenne à —0°,1. Dans deux expériences, on a ouvert préalablement le canal vertébral. Dans un cas, il y a eu une attaque faible, clonique, asymétrique, à —1°,2 et dans l'autre, une attaque beaucoup plus forte, présentant même une composante tonique, à —1°,5.

L'un de nous a pu faire à Cuba, à La Habana, au mois de Décembre 1941, des expériences sur des *R. catesbeiana*. Les Grenouilles de cette espèce, importées aussi d'Amérique du Nord, sont dans l'île depuis 20 ans environ. Dans la préparation moelle isolée-train postérieur, on enlevait les muscles du dos. La température du bain réfrigérant a varié entre 0,3 et 1° C. Dans un cas, il y a eu des contractions cloniques fortes et prolongées. Dans les autres cas, il y a eu des attaques nettes, quoique faibles. C'étaient des attaques semblables à celles que l'on obtient quand la température du bain est trés proche de la limite supérieure. On a eu l'impression que cette limite se trouve aux environs de 1° C.

DISCUSSION

L'ensemble des résultats ci-dessus exposés, nous démontre que les caractères et les conditions de production de l'attaque de cryoépilepsie varient non seulement avec l'espèce, comme aussi avec le climat et d'autres conditions locales de l'habitat des Grenouilles. Les séries d'expériences faites avec le *Leptodactylus ocellatus* de régions différentes, démontrent que, pour une même espèce, il y a des modifications de deux ordres : 1) un changement de la limite supérieure de la température de production de l'attaque; 2) des changements dans la forme, l'intensité et la durée de l'attaque.

La limite supérieure montre des relations nettes avec la température moyenne du pays, comme on le voit par le tableau suivant.

Ville	*Temp. moyenne*	*Limite supérieure*
Montévidéo	16,3	5,0
Buenos-Aires	16,6	5,0
Rosario de Santa Fé.	17,2	7,0
São Paulo	17,6	7,0
Belo Horizonte	20,4	8,0
Rio de Janeiro	23,4	8,5
Recife (Pernambouc)	26,5	12,0

Étant donnée la petite précision des déterminations de la limite supérieure, on peut admettre, en prémière approximation, des relations linéaires entre les deux variables. Ce qui est vraiment intéressant, c'est que la limite supérieure est d'autant plus basse que le climat est plus froid. Cependant, il paraît qu'il y a une limite à cette adaptation, puisque l'espèce *Leptodactylus ocellatus* disparaît dans les régions méridionales de l'Amérique du Sud. En Argentine, on ne la trouve que

jusqu'à une ligne passant à 80 kilometres environ au Sud de Buenos--Aires.

Dans un même climat on observe des modifications spécifiques de la limite supérieure. C'est le cas de Belo Horizonte. Tandis que cette limite supérieure est de 8°,0 pour le *Leptodactylus ocellatus,* elle monte à 12° pour le *L. pentadactylus*.

Les changements de forme observés chez des représentants de la même espèce dans des régions différentes ne semblent pas être dûs à des conditions de climat. Ainsi, les climats de Buenos-Aires et de Montévidéo sont très sensiblement les mêmes. Cependant, les formes de l'attaque des Grenouilles de l'une et l'autre de ces villes sont tout-à-fait différentes. Nous sommes autorisés à croire, et cela comme hypothèse de travail, qu'il y a une influence marquée de la composition de l'eau des marais ou des collections où vivent les Grenouilles. Des études préliminaires nous ont montré la grande influence du calcium sur la forme de l'attaque (18). D'autre part, les expériences faites sur les *L. ocellatus* que nous avons apporté de Montévidéo à Rio ont montré que la forme de l'attaque change et se rapproche progressivement de celle des Grenouilles de Rio.

Aucune des espèces de Grenouilles habitant des climats tempérés ne donne l'attaque épileptiforme par refroidissement de la moelle, à des températures supérieures à celle de la congelation de l'eau. C'est ce qui résulte des expériences réalisées à Milan, Paris, Lisbonne, avec des grenouilles d'espèces differentes, ainsi que des expériences poursuivies en Amérique du Nord avec les *Rana pipiens* et les *R. catesbeiana.* La série d'expériences faites en plusieurs endroits avec des Grenouilles de cette espèce, qui se sont facilement adaptées à des climats tropicaux, nous permettent de saisir une transformation progressive. Aucune réaction aux environs de 0°, dans leur pays d'origine, dans les expériences faites sur place. Aucune réaction ou de petites réactions -- tremblements, contractions cloniques isolées — et cela encore avec des spécimens petites et très jeunes, peu de temps après le début de l'acclimatation dans un pays chaud. Des attaques beaucoup plus nettes, quoi que encore faibles, aux environs de 0°, dans le cas des *R. catesbeiana* acclimatées depuis quatre ans à un pays chaud. Des attaques plus nettes encore, à des températures déjà au-dessus de 0° dans le cas des *catesbeiana* acclimattées à Cuba depuis plusieurs générations. On ne peut pas s'empêcher de rapprocher de ces faits, les résultats obtenus par E. Cordero. Les seules espèces de *Rana* vivant dans des régions chaudes (*R. palmipes* du Venezuela), donnent l'attaque à plusieurs dégrés au-dessus de 0° (communication personelle).

L'ensemble de ces recherches pose donc des problèmes nouveaux et précis, non seulement dans le champ de la Physiologie au sens strict du terme, comme aussi dans le champ de la Biologie générale. Il nous

faudra encore cueillir beaucoup d'autres données avant de pouvoir arriver à des conclusions sûres sur tous ces problèmes.

Nous présentons ici nos plus vifs remercîments à tous les collègues et amis qui nous ont accueilli dans leurs laboratoires et nos ont facilité l'éxécution des expériences : Prof. ROCHA FRAGA (†) et Dr. A. COUTINHO (Pernambouc) ; Prof. OCTAVIO MAGALHÃES et Prof. BAETA VIANNA (Belo Horizonte) ; Prof. CLEMENTE ESTABLE (Montévidéo) ; Prof. B. A. HOUSSAY (Buenos-Aires) ; Prof. J. T. LEWIS (Rosario de Santa Fé) ; Prof. J. F. FULTON (New Haven) ; Prof. H. PIERON, Drs. A. CHWEITZER et SÉGAL (Paris) ; Prof. FERREIRA DE MIRA et Dr. JOAQUIM FONTES (Lisbonne) ; Dr. RIBEIRO DO VALLE (São Paulo) ; Dr. CÔRO (La Habana). A Messieurs CARLOS GUINLE et MARIO DE ALMEIDA, qui nous ont gracieusement offert les spécimens de *Rana catesbeiana,* nous exprimons ici toute notre reconnaissance.

CONCLUSIONS

1. Les recherches sur l'attaque de croyépilepsie donnée par les *Leptodactylus ocellatus* de régions différentes (Buenos-Aires, Rosario de Santa Fé, Montévidéo, Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte, Pernambouc), nous montrent que la limite supérieure de température de production de l'attaque est d'autant plus élevée, que le climat de la région est plus chaud.

2. La forme de l'attaque n'est pas la même pour toutes les régions observées. La forme elle-même ne dépend pas du climat. Tout porte à croire que la composition de l'eau où se trouvent les Grenouilles est la cause principale des variations de la forme.

3. Dans une même région, donc toutes les conditions de climat et de l'habitat étant les mêmes, on observe des variations de la limite supérieure, ainsi que de la forme de l'attaque, si l'on étudie les phénomènes dans des espèces différentes de Grenouilles. Ainsi, à Belo Horizonte, la limite supérieure est de 8° pour le *Leptodactylus ocellatus,* et de 12° pour le *L. pendactylus.* Il y a aussi des différences assez marquées de la forme de l'attaque donnée par les animaux appartenant à ces deux espèces.

4. Les Grenouilles du genre *Rana,* en Europe et en Amérique du Nord (New Haven) ne donnent l'attaque par refroidissement brusque de la moelle isolée, que si la température de la moelle descend au-dessous de 0°.

5. Chez les Grenouilles européennes, l'attaque présent des formes variées et rarement les réactions des deux côtés du corps sont symétriques.

6. L'attaque chez les *Rana pipiens* de l'Amérique du Nord peut être obtenue aux environs de 0° C., si le canal vertébral est ouvert et la moelle directement exposée à l'action du froid. Dans les conditions habituelles des expériences, elle ne se produit qu'au-dessous de 0°.

7. Les grosses Grenouilles de l'espèce *Rana catesbeiana* ne donnent l'attaque qu'au-dessous de 0° C., en Amérique du Nord. L'acclimatation dans un pays chaud change petit à petit les conditions de production de l'attaque et, chez les exemplaires de La Habana (l'espèce étant élevée à Cuba depuis 20 ans environ), nous avons obtenu des attaques jusqu'à +1° C. L'adaptation est lente et met plusieurs années à se produire, comme l'ont démontré les expériences faites à Rio de Janeiro, où l'élevage est beaucoup plus récent.

RESUMO E CONCLUSÕES

1. As pesquisas sôbre o ataque de crioepilepsia dado pelos *Leptodactylus ocellatus* de regiões diferentes (Buenos-Aires, Rosario de Santa Fé, Montevidéo,

Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte, Pernambuco), mostram-nos que o limite superior da temperatura de produção do ataque é tanto mais elevado, quanto o clima da região é mais quente.

2. A forma do ataque não é a mesma em todas as regiões observadas. A forma em si mesma não depende do clima. Tudo leva a acreditar que a composição da água em que se acham as Rãs é a causa principal das variações da forma.

3. Em uma mesma região, todas as condições de clima e de *habitat* sendo as mesmas, observam-se variações do limite superior, assim como da forma do ataque, si os fenômenos são estudados em espécies diferentes de Rãs. Assim, em Belo Horizonte, o limite superior é de 8º para o *Leptodactylus ocellatus* e de 12º para o *L. pentadactylus*. Existem tambem diferenças bastante acentuadas da forma do ataque dado por animais pertencentes a essas duas espécies.

4. As Rãs do gênero *Rana*, na Europa e na América do Norte (New Haven), só dão o ataque pelo resfriamento brusco da medula isolada, quando a temperatura da medula desce abaixo de 0º.

5. Nas Rãs européas, o ataque apresenta formas variadas e, raramente, as reações dos dois lados do corpo são simétricas.

6. O ataque nas *Rana pipiens* da América do Norte pode ser obtido nas vizinhanças de 0º C., se o canal vertebral está aberto e a medula diretamente exposta à ação do frio. Nas condições habituais das experiências, o ataque só se produz abaixo de 0º.

7. As grandes Rãs da espécie *Rana catesbeiana* só dão o ataque abaixo de 0º C., na América do Norte. A aclimatação a um país quente altera pouco a pouco as condições de produção do ataque e, nos exemplares de Havana (essa espécie é criada em Cuba há cerca de vinte anos), obtivemos ataques até cerca de +1º. A adaptação é lenta e leva vários anos a produzir-se, como demonstraram as experiências feitas no Rio de Janeiro onde a criação dessas Rãs é muito mais recente.

BIBLIOGRAPHIE

1. FREITAS, O., 1909, *Geographia medica e climatologia do Estado de Pernambuco*. Mem. apresentada ao 4.º Congresso Med. Latino-Americano, Rio de Janeiro, 1909, 7 pp.

2. FREITAS, O., 1905, *O clima e a mortalidade da cidade do Recife*, Recife, 1905, 95 pp.

3. GIOVANNINI, J., 1930, *O Clima de Bello Horizonte*, Bello Horizonte, 47 pp.

4. HANN, J., 1910, *Handbuch der Klimatologie*, Stuttgart, 1910, 2.º vol., cf. p. 348.

5. MORIZE, H., 1922, *Contribuição ao estudo do clima do Brasil*, Rio de Janeiro, 1922, VI+118 pp.

6. OZORIO DE ALMEIDA, M., 1937, Action du refroidissement brusque de la moelle isolée chez la grenouille européenne, *C. R. Soc. Biol., Paris*, 126:196-198.

7. OZORIO DE ALMEIDA, M., 1939, Variations des caractères de l'attaque épileptiforme par refroidissement brusque chez le *Leptodactylus ocellatus* produites par les conditions ambientes, *C. R. Soc. Biol., Paris*, 130:1485-1488.

8. OZORIO DE ALMEIDA, M., 1939, Sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle épinière chez la Grenouille européenne, *C. R. Soc. Biol., Paris*, 132:233-235.

9. OZORIO DE ALMEIDA, M., 1943, Recherches sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle chez la grenouille, *J. Neurophysiol.*, (en presse).

10. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1938, Sur quelques causes d'erreur dans l'étude du tonus musculaire chez la grenouille, *C. R. Soc. Biol., Paris*, 127:717-720.

11. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1938, Sur la production de l'attaque épileptiforme par refroidissement brusque de la moelle chez des espèces autres que la Grenouille Sud-americain, *C. R. Soc. Biol., Paris*, 128:213-216.

12. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1940, Sur le réflexe du saut chez la grenouille, *C. R. Soc. Biol., Paris*, 133:713-716.

13. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1940, Observações sobre o ataque epileptiforme produzido pelo resfriamento brusco da medula feita nas Rãs da região de Bello Horizonte, *Brasil Médico*, 54: 315-316.

14. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1941, Recherches sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle épinière. Première mémoire. — Introduction et technique. *Rev. Brasil. Biol.,* 1(2):165-177.

15. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1941, Recherches sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle épinière. Mémoire deuxième. Étude physiologique du phénomène chez le *Leptodactylus ocellatus* des environs de Rio de Janeiro, *Rev. Brasil. Biol.,* 1(2): 179-194.

16. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1941, Recherches sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle épinière (Cryoépilepsie). Mémoire troisième. — Étude de l'influence de quelques facteurs sur les caractères du phénomène chez le *Leptodactylus ocellatus* des environs de Rio de Janeiro, *Rev. Brasil. Biol.,* 1(4): 393-407.

17. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1942, Recherches sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle épinière (Cryoépilepsie). Mémoire quatrième. Le periode latente de l'attaque chez le *Leptodactylus ocellatus* des environs de Rio de Janeiro, *Rev. Brasil. Biol.,* 2(4):455-471.

18. OZORIO DE ALMEIDA, M. & VIANNA DIAS, M., 1935, Recherches pharmacologiques sur l'attaque épileptiforme produite chez la Grenouille par le refroidissement brusque de la moelle isolée, *C. R. Soc. Biol, Paris.,* 121: 771-773.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 67-82
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

RAÇAS DO VIRUS DO TIFO EXANTEMÁTICO NEOTRÓPICO NO BRASIL [1]

OCTAVIO DE MAGALHÃES e ADYR ROCHA

(Com 14 figuras no texto)

Em 1932, LEMOS MONTEIRO, FONSECA & PRADO se referiram ao insulamento de um virus de ratos, na zona urbana de São Paulo, cujas propriedades levaram os autores às seguintes conclusões :

> "1 . . . . somos levados a acreditar na possibilidade de serem os ratos depositários dos virus do tifo exantemático de São Paulo.
>
> 2 — Estes resultados experimentais, embora até certo ponto, não possam ser considerados definitivos, trazem algum apoio à hipótese, já emitida por um de nós, da possibilidade do tifo exantemático de São Paulo manifestar-se sob duas formas, talvez distintas, pelo aspecto clínico, imunológico, patogênico e epidemiológico, como acontece com o tipo tropical dos estados maláios".

O virus urbano insulado pelos A.A. paulistas era menos patogênico para os cobáios e não conferiu imunidade contra o virus da zona urbana ou rural. Temos hoje certa dificuldade em fazer um juizo definitivo sôbre a natureza daquele virus, pois os A.A. só trabalharam até a quarta passagem dos mesmos em animais de laboratório. Nossa impressão, porém, é que, talvez, eles tenham insulado um virus que hoje nós classificamos e adiante se verá, como VA2. Já fizemos isto com vários outros, insulados de roedores silvestres. Os ratos, no tifo exantemático de São Paulo, ou melhor no tifo exantemático neotrópico no Brasil, ou o que ainda seria talvez mais justo, "doença de Piza, Gomes e Meyer", não tem grande importância como reservatório de virus. O ciclo do virus não depende dos ratos. O papel destes é realmente secundário na eclosão dos fócos, nas epidemias domiciliares ou não. Seja como fôr, na dúvida em que ficámos, sôbre aquele trabalho, poderíamos

---

1 Recebido para publicação a 31 de Dezembro de 1942.
Trabalho do Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina da U. M. G. e do Serviço de Estudos das Grandes Endemias do Instituto Oswaldo Cruz, apresentado à Sociedade de Biologia de Minas Gerais na sessão de 11 de Março de 1942.

tambem supôr a existência entre nós de um outro tipo de tifo exantemático — "tipo Murino". Em 1941, SALES GOMES apresenta a observação de 4 casos provaveis do tifo endêmico ou Murino. Foi MAXCY, em 1926, quem iniciou os verdadeiros estudos sôbre essa forma do tifo exantemático. Depois dele nos Estados Unidos, na Europa e na América do Sul, numerosos trabalhos apareceram sôbre o assunto. É muito possivel, é mesmo quase certo, que tenhamos realmente tambem esse tipo "Murino", da grande família do tifo exantemático. E por que não o teríamos ? O trabalho do notavel experimentador paulista deixa bem claro o fáto. Ele, porém, com sábia prudência não o afirmou categoricamente. Disse textualmente :

> "a fazer afirmativas peremptórias, preferíamos antes chamá-los provaveis, pelo menos até que possamos isolar de novo, para o estudo mais detalhado, o virus de outros doentes, ou, então, o virus de ratos urbanos".

Ainda que tenhamos essa modalidade no grupo do tifo exantemático, podemos assegurar que o Tifo exantemático neotrópico, no Brasil, tem realmente as formas : *a*) Inaparente; *b*) Benigna; *c*) Grave; e, *d*) Fulminante. Aliás, agora, depois dos trabalhos brasileiros, os americanos do norte, na Febre exantemática das Montanhas Rochosas, já admitem essas mesmas modalidades clínicas, unificando a moléstia do Oéste e do Léste, de modo a não mais termos síndromos clínicos somente graves ou somente benígnos, dentro de uma única e mesma moléstia infecto-contagiosa.

Em Minas Gerais, tivemos condições excepcionalmente vantajosas de trabalho, para estudar a doença. Daí os resultados insofismaveis que conseguimos. Desde que há dez anos vimos trabalhando com o tifo exantemático neotrópico, no Brasil, seguramente 228 amostras do virus, provenientes de homens e animais, originais ou de passagem, já foram insuladas e cuidadosamente estudadas por nós, em suas propriedades gerais ou especiais, ora durante meses, ora durante anos. A nossa sorte nessas pesquisas foi que anotáramos, desde os primeiros estudos, minuciosamente, tudo que íamos apurando. Estamos hoje de posse, por isso, de um arquivo rico e expressivo, que nos permitiu, como no escorpionismo, tirar algumas conclusões de relevo, que vamos hoje aquí expôr, bem como as experiências feitas posteriormente, a-fim-de comprovar nossas hipóteses.

Se já há muito não falamos de "raças" de virus do tifo exantemático no Brasil, hipótese só recentemente formulada taxativamente em nossos trabalhos, uma cousa já havia sido anotada firmemente, desde o início de nossas pesquisas, isto é, que as amostras de virus nas mesmas condições de pesquisa não se comportavam sempre da mesma maneira. No começo, como é de bom preceito científico, supusemos erro de técnica pessoal ou de nossos auxiliares. Provavelmente não colhía-

mos em época apropriada e em bôas condições, nas passagens pelos animais de laboratório, o virus do tifo exantemático, no Brasil. Era possivel que fosse tambem uma questão de sensibilidade animal ou de quantidade de virus, etc. Daí as diferenças encontradas. Daí o desaparecimento dos virus em muitos casos. Prestando mais atenção, porém, aos fatos, mudando de auxiliar, de técnica, de animais, fazendo nós mesmos os trabalhos, em meses e anos diversos, os fatos se repetiam com uma constância impressionante, só apurada pela longa experiência e maior observação e que vieram mostrar que estávamos diante de um fato novo, que deveria ser estudado.

Há virus, cuja passagem de um animal, em período febril, para outro sensivel, não provoca reações externas ou térmicas, nem os imuniza à uma inoculação posterior do virus clássico, perdendo-se já na 3.ª passagem. Outros virus reagem desde a 1.ª passagem, com lesões e termograma típicos, apresentando tempo de incubação variavel, porém, cada vez menor, até se estabilizar em 4 a 5 dias. Outros ainda apresentam sempre termograma com esplenomegalia, mas sem reações testicular ou vulvar, com períodos de 5 a 6 dias de incubação, conservando estas propriedades indefinidamente. Outros, desde o início, teem pequeno período de incubação, com lesões típicas, atenuando-se já no fim da 5.ª passagem. Ainda outros, com pequeno periodo de incubação e reação térmica, dão apenas esplenomegalia, perdendo-se já no fim da 3.ª passagem. Finalmente outros, embora provocassem no animal uma reação térmica, não o imunizavam à uma posterior inoculação do virus clássico. Foi daí que partimos para os primeiros estudos, cujas conclusões vamos agora apresentar.

Trabalhamos hoje com as *raças* de virus que denominaremos :

VB — Raça do virus brasileiro clássico, de origem humana.

VA1 — Raça do virus brasileiro atenuado de origem humana (M.S.F.)

VA2 — Raça do virus brasileiro atenuado de origem humana (E.F.)

O virus V.B. já foi por nós estudado exaustivamente, nas propriedades gerais e especiais e quase tudo já está publicado. Ele provinha de regra, na sua origem, de sangue de doentes com as formas graves da moléstia, em pleno período febril. O VA1 proveiu de sangue de doente que estudámos e publicámos em 1941. Tratava-se de um caso de moléstia inaparente, no sentido exato da palavra, como a descreveu CHARLES NICOLLE.

A amostra VA2 provinha tambem de sangue humano do mesmo fóco de VA1, colhida no mesmo dia, quase à mesma hora, de outra menina, a qual apresentava, com 39°,5 de temperatura axilar, 128 de pulso, mas estava de pé, trabalhando, sem nada denotar, a não ser a face

corada. Moravam ambas na mesma casa do doente M.F.F., morto com a forma grave da moléstia, pela mesma época. Esta segunda menina, da qual insulámos o VA2, vestiu-se para ir à cidade passear e no dia seguinte e subsequentes à nossa observação nada mais apresentou digno de nota. Tratava-se positivamente de uma forma benigna, pois o exame clínico, o mais minucioso possivel, nada mais demonstrou, além da febre, que merecesse registo. Depois de estudos comparativos com o nosso arquivo, com outros casos que se apresentaram, chegámos à conclusão de que se deveria tratar de "raças padrões" do virus brasileiro em torno das quais se poderiam talvez grupar outras variantes do virus do Tifo exantemático no Brasil. Para documentar melhor a nossa hipótese, empreendemos uma série de estudos sistemáticos comparativos ou não, da seguinte maneira :

COMPORTAMENTO DO VIRUS

1 — Tempo de incubação da moléstia experimental
2 — Duração da moléstia experimental
3 — Reação dos animais sensiveis { Externas e Internas { Reações térmicas, testiculares, vulvares, esplenomegalia, peritoneal, ganglionar, etc.
4 — Percentagens de mortes .... { Rhesus, Cobaio, Coelho, Morcego
5 — Sensibilidade ao virus do .... { Cobaio, Rhesus, Coelho, Morcego
6 — Imunidade cruzada
7 — Reação de Weil-Felix .... { Na moléstia natural, Na moléstia experimental
8 — Ação da glicerina
9 — Congelação
10 — Ensaios com Precipitinas
11 — Reação de fixação do complemento
12 — Anatomia Patológica .... { Macroscópica, Microscópica
13 — Presença de Rickettsias
14 — Poder patogênico para o homem.

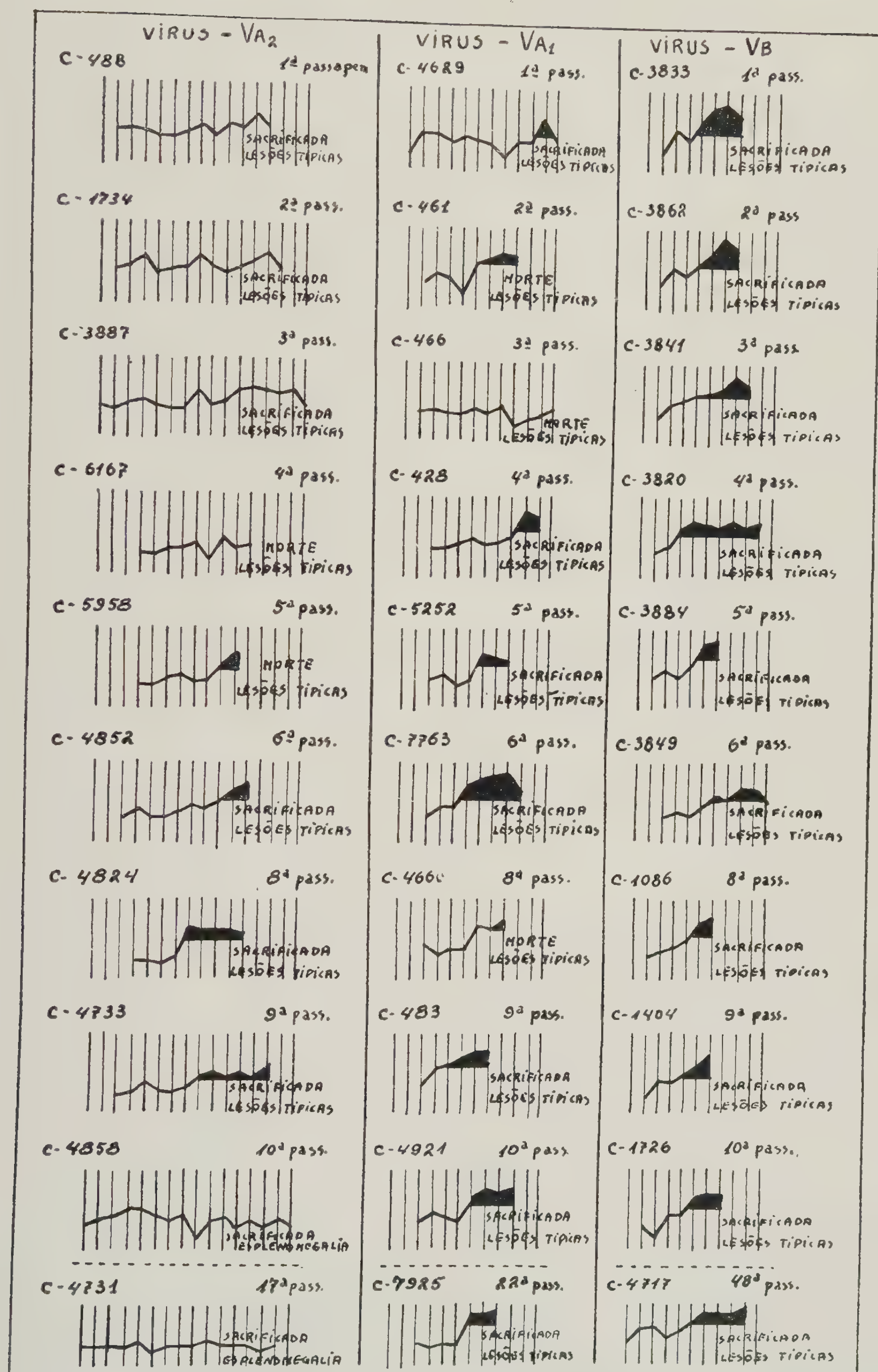


Fig. 1 — Tempo de incubação na moléstia experimental. Experiências, em cobáios, com virus de origem humana.

Tempo de incubação na moléstia experimental

A) No cobáio, Cavia porcellus (L. 1766)

O virus VB tem, desde o início, o mesmo tempo de incubação. Na primeira passagem, na quinquagésima quinta ou na centésima, segundo o que já afirmámos, ele medeia de 24 horas a 6 dias. Em casos excepcionais, esporádicos, dependendo aí sim da resistência individual, esses tempos podem extender-se. São, porém, na série de experimentação com virus, casos insulados, sem significação para a biologia do virus, pois na passagem seguinte, quando isso se apura, em indivíduos do mesmo lote, inoculados conjuntamente, ele recupera as características anteriores. As primeiras passagens do virus VA1 nunca começam como as do VB. A incubação inicial é de 7, 10 e 11 dias (fig. 1). Dir-se-ia um VB inadaptado ainda aos animais de laboratório. As lesões são típicas, desde o início, mas a reação térmica só se exterioriza no dia ou na véspera da morte. Depois das primeiras passagens, o tempo de incubação se encurta, ele se aproxima do VB e se fixa exatamente como neste. A raça do virus VA2 é absolutamente diferente desses dois primeiros. A incubação nas primeiras passagens não existe, porque não existe reação térmica. Os cobáios de regra não morrem, mas sacrificados, mostram lesões típicas. Após as primeiras passagens, cinco ou seis, há o aparecimento da reação febril, variando a incubação de 3 a 8 dias (fig. 1) com a sequência das passagens, a temperatura torna a desaparecer, como expressão

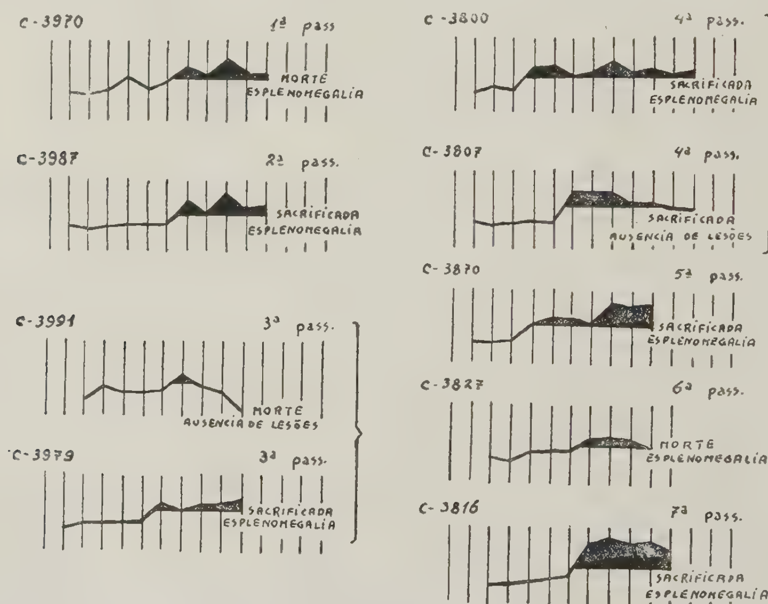


Fig. 2 — Tempo de incubação na moléstia experimental. Experiências, em cobáios, com virus insulado de cão (n.º 47) naturalmente infectado.

mórbida e o ciclo nos cobáios oscila entre a ausência de febre com lesões e a *presença de febre*, com lesões típicas. A duração média da moléstia declarada no cobáio com o virus VB é de 8 dias, considerando isso pela reação febril, que coincide quase sempre com a presença do virus no sangue. No virus VA1 essa durabilidade é muito menor, dificilmente atingindo 6 dias. Com o virus VA2, não havendo quase mortes, pode-se dizer que excepcionalmente, nos casos em

os quais é apurado, ela póde durar 6 dias. Com o virus VB, nas diferentes amostras com que trabalhámos, a percentagem de morte para cobáios variou de 70 a 93 %, dando sempre reações características. No VA1 a percentagem foi de 44 % dos animais inoculados e no VA2 atingiu a 24 % do total infectado. As reações, compreendendo a testicular, ocular, ganglionar, esplenomegalia, etc., são desde o início, muito expressivas e eloquentes com a raça de virus VB, assim se conservando em todas as passagens seguintes. Essas reações, menos a ocular, existem no virus VA1 e no VA2, desde o começo, mas enquanto no VB e no VA1 elas permanecem, no VA2 elas podem desaparecer, reduzir-se a uma simples

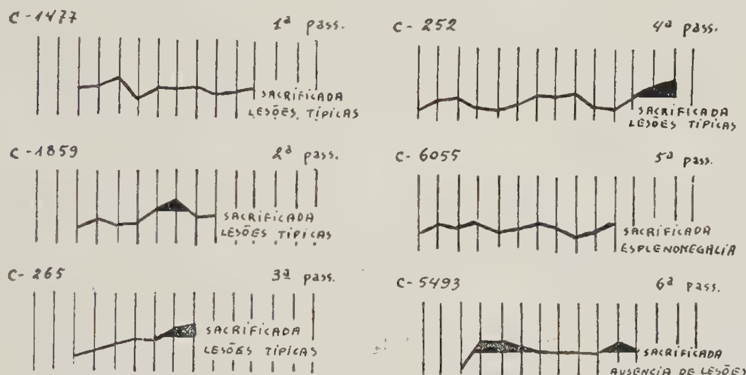


Fig. 3 — Tempo de incubação na moléstia experimental. Experiências, em cobáios, com virus insulados de percevejos colhidos em cama de doente.

esplenomegalia ou apagar-se completamente, perdendo-se o virus, pelo menos aparentemente. Aliás, MAGALHÃES já havia dito, em 1939 :

> "Temos a impressão de que melhor índice que a elevação térmica, para a determinação do virus da febre exantemática mineira, é a esplenomegalia".

O virus VA2 não raro pode permanecer, tendo para expressão da sua existência apenas a esplenomegalia e em passagens seguintes se exaltar de novo, dando outra vez reações térmica e testicular. Um dos seus característicos fundamentais, é essa oscilação durante muito tempo, no cobáio, das manifestações patogênicas visiveis. Igual a essa variedade nós já temos encontrado virus insulados de vários animais, inclusive artrópodos (figs. 2 e 3).

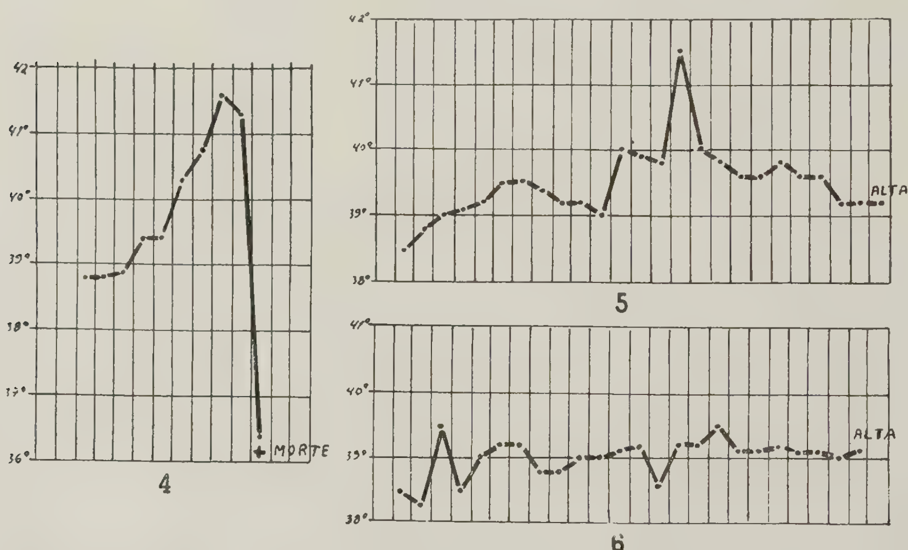
B) No Macaco Rhesus, Silenus rhesus, Macaca mulatta

No Rhesus o virus VB produz uma doença experimental das mais nítidas e típicas. A incubação varia de 24 a 72 horas. A duração, média da doença é de 7 dias. Não raro apuramos a queda súbita da temperatura em crise e ele mata de 90 a 99 % dos animais, com lesões típicas, inclusive exantema. Esses dados são tirados de algumas dezenas de Rhesus, em os quais fizemos essas experiências (fig. 4).

O virus VA1 dá uma incubação muitíssimo maior, podendo chegar a 10 dias, quando inoculado por via intra-peritoneal no Rhesus. A reação febril pode ser alta, mas é de pouca duração e o virus não mata o animal. A amostra VA2, no período já estabilizado, não dá reação térmica, nem mata o Rhesus (figs. 5 e 6).

C) **No coelho**, Oryctolagus cuniculus (**L. 1766**)

As três raças do virus são virulentas para os coelhos. O virus VB dá no coelho uma moléstia aparente só em 53,35 % dos animais. Dessa percentagem, que reage febrilmente, só 36,66 % morre da moléstia. O tifo experimental no coelho, com o virus VB, é muito semelhante ao do cobáio. A reação febril é alta, duradoura. A média de incubação é de 3 dias e a durabilidade da doença de 6 a 14 dias. Há esplenomegalia, reação testicular, até com gangrena do escroto. Os animais perdem muito de peso, podendo atingir a 38 % do peso primitivo. Com as raças VA1 e VA2 a incubação é de regra bem mais longa, embora a reação febril, com o VA1 seja mais alta e prolongada do que a do VA2. Com as raças VA1 e VA2 raramente há moléstia aparente. Quando há reação térmica ela se inicia do 9.º para o 10.º dia após a inoculação virulenta. No período já estabilizado destas raças os coelhos inoculados não morrem (figs. 7-9).



Tempo de incubação na moléstia experimental. Inoculação por via intraperitonial — Fig. 4: Rhesus 15, amostra VB; fig. 5: Rhesus 21, amostra VA1; fig. 6: Rhesus 22, amostra VA2.

D) Nos morcegos

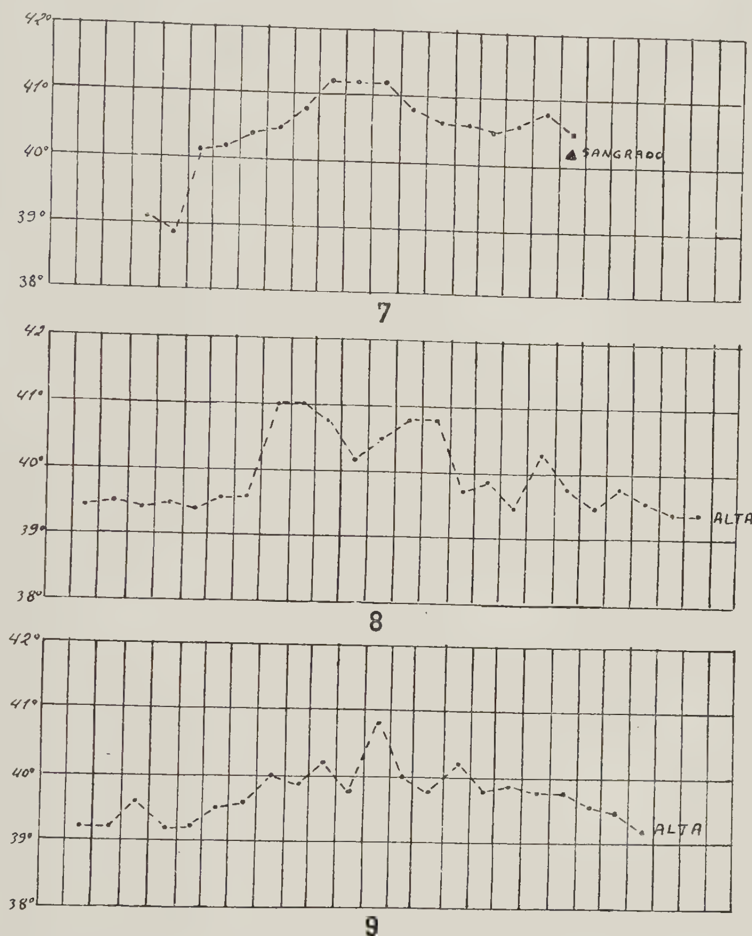
Trabalhámos com 3 espécies destes animais. Estudando os morcegos, vemos que o virus VB é patogênico para o *Histiotus velatus* e *Hemiderma perspicilatum,* matando-os com lesões típicas e que se reinsula o virus do sistema nervoso central. Ele não mata o *Desmodus rotundus rotundus* (E. Geoffroy). A raça VA1 não é patogênica, no período já adaptado, para nenhum dos três tipos de morcego. A raça VA2 não é patogênica para *Desmodus rotundus rotundus* e *Hemiderma perspicilatum.* Não poude ser ensaiado com o *Histiotus velatus.*

As espécies de morcegos foram gentilmente classificadas pelo Dr. Carlos Vieira, do Museu Paulista, a quem muito agradecemos.

Imunidade cruzada

Vejamos alguns fatos, que explicam perfeitamente o nosso pensamento a respeito da imunidade cruzada das moléstias do grupo "tifo exantemático" (fig.

10). Tomemos um cobáio macho n.º 2. Inoculemos com a raça VB do virus brasileiro. Dentro de certo período, já estabelecido, aparece uma reação térmica e testicular típica. Um grupo pequeno de animais salva-se. Cai a temperatura e o quadro térmico aproxima-se do normal. O animal ganha nova-



Tempo de incubação na moléstia experimental — Fig. 7 : Coelho 1646 inoculado por via subcutânea com virus VB; fig. 8 : coelha 7680 inoculada por via peritonial com virus VA1; fig. 9: coelha 7077 inoculada por via peritonial com virus VA2.

mente o peso e tudo parece desaparecer. No dia imediato àquele em que a temperatura chega ao normal reinoculámos esse mesmo cobáio com a mesma amostra da raça VB do virus. Que acontecerá ? Tivemos numerosos animais que reagiram de novo, apresentando reações típicas, podendo mesmo morrer a essa segunda inoculação. Poder-se-ia argumentar que o cobáio não estava imunizado, tendo havido apenas uma reativação e ainda outras hipóteses. Seria inutil aquí repisar. Tomemos agora o cobáio n. 45. Inoculemos com a raça VB do virus brasileiro e, desaparecidas as reações térmicas e testiculares, reinoculemos, dez dias após a quéda da temperatura, com a mesma raça VB do virus brasileiro. Ainda dessa vez podemos ter novas reações específicas, inclusive reações térmicas, podendo morrer o animal. Façamos essa segunda inoculação não 10 dias, senão que 20 e 40 dias após o abaixamento térmico e os fatos se repetirão

sem discrepância, em 20 a 30 % dos animais experimentados. Os 70 a 80 % dos animais restantes não apresentam reação térmica testicular ou esplenomegálica a esta segunda inoculação da raça VB do virus brasileiro. As passagens sucessivas demonstram nesses casos que houve imunidade duradoura. Dessa maneira, si nós seguirmos o que afirmam os clássicos em matéria de imunidade cruzada, em 70 a 80 % dos casos se tratava do mesmo virus, em 30 ou 20 % de virus diferente, apesar das contraprovas terem sido feitas com a mesma amostra de virus VB, nas mesmas condições de experiência e com os mesmos animais ! Isto mostra claramente a sem razão das conclusões rígidas que sôbre este assunto se querem formular. Não é só esse ponto que, no capítulo da chamada imunidade cruzada, precisa ser revisto. É tambem e em primeiro lugar a questão de

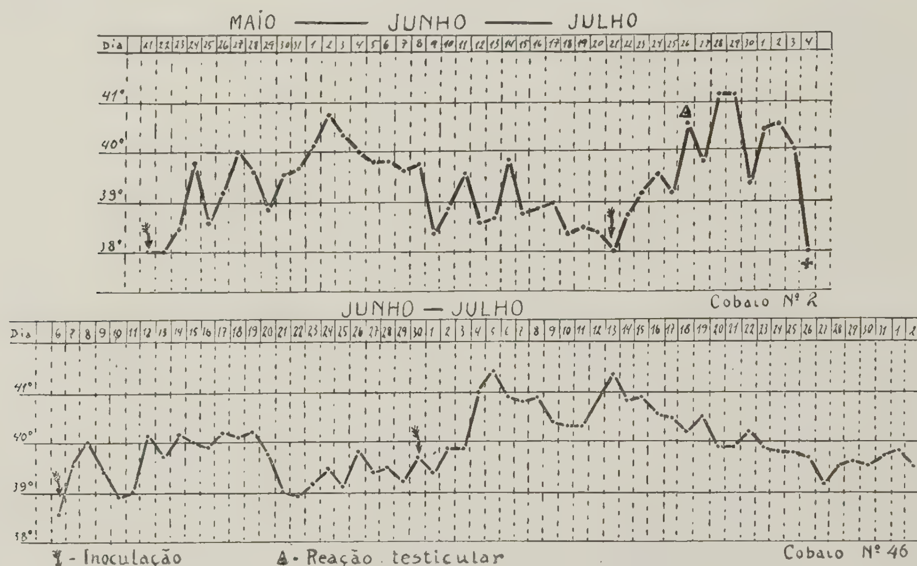


Fig. 10 — Experiências de imunidade cruzada.

saber qual o índice certo para se ter a convicção de que o animal ficou ou não absolutamente imune, após uma infecção de vacina ou de virus ativo. O índice térmico, apenas, como até aquí se tem feito, é positivamente falho. As moléstias "inaparentes" ou "inaparentes e mortais" pela evolução do virus silenciosamente, são muito mais frequentes do que se pensa e servem de provas eloquentes e expressivas ao nosso acerto. O índice térmico apenas de um animal reinoculado, para prova de imunidade cruzada, sem passagem posterior em animais sensiveis, não vale ao nosso ver grande cousa. Já Magalhães, em 1941, havia feito esta afirmação. Aquí agora ainda a confirmamos. Em outro trabalho de 1941, Magalhães disse :

> "Pensamos hoje dever apurar sempre tambem pelas necropsias, passagens posteriores em cobáios e rhesus, si houve ou não desenvolvimento de virus nos orgãos dos animais infectados, após a respectiva imunização; si após o emprego de uma vacina preparada com virus ou de uma moléstia provocada experimentalmente por determinado virus, os animais injetados com a raça de virus suposta diversa, não teem febre, reação escrotal ou qualquer outro desses fenômenos exteriores da moléstia, mas teem no corpo a evolução, silenciosa embora, desse 2.º virus,

não se póde dizer que os virus sejam idênticos pela prova da imunidade cruzada. São idênticos na aparência".

Mesmo com imunidade cruzada certa e absoluta não se pode concluir pela igualdade dos virus. Há exemplos bem conhecidos de virus diferentes que se imunizam mutuamente. Nas moléstias do grupo tifo exantemático a *imunidade cruzada é um meio auxiliar bom para separar grupos, não espécies de virus*. Não é o que se vê ainda hoje com os Espiroquetas e Leishmanias e se apurava, até pouco tempo, com os Tripanosomas ? Em nosso caso, de raças de virus do tifo exantemático no Brasil, guiamo-nos por esse critério e podemos assegurar que, no período já adaptado, a raça de virus VA2 não imuniza o animal sensivel contra o VA1 e o VB. As raças de virus VA1 e VB comportam-se igualmente, ora dando, ora falhando, na imunidade cruzada. A raça VB imuniza contra as raças VA1 e VA2.

Reação de Weil-Felix

No estudo da Sorologia, publicado em 1939, MAGALHÃES já havia mostrado o que vale essa pesquisa em moléstias humanas e de animais. No homem, seu valor é relativo para o diagnóstico. Nos casos, porém, de moléstia demorada, o Weil-Felix é um poderoso auxiliar como meio de diagnóstico, não só no período de "estado", como retrospectivo da moléstia recente. Disse então :

> "Quando a moléstia é longa, pela resistência maior do doente, ou pela menor virulência do virus, a reação Weil-Felix é um índice seguro para o diagnóstico. Estamos tambem convencidos hoje de que um Weil-Felix a 1 por 50, já é elevado para o diagnóstico da moléstia exantemática em Minas Gerais, em homens e em animais".

Diríamos agora que 1 por 50 é o bastante para o diagnóstico, se afirmando tambem os demais pontos. Nos animais é preciso esclarecer mais a questão. Em 1933 MOREIRA & MAGALHÃES disseram que o "Weil-Felix nos animais é quase sempre negativo". Hoje é preciso distinguir nos animais os resultados da reação de Weil-Felix na moléstia experimental e natural. Na moléstia experimental no cobáio, no rhesus e nos coelhos, com o virus VB, de regra o Weil-Felix é negativo. Encontrámos num "Cebus" um título de 1 para 160 para o OX19 e uma vez num coelho, com 15 dias de moléstia, 1 para 160 para o OX19, OX2, OXK, OXL. Nos cães inoculados, e o foram em número de 13, em 10 obtivemos resultados positivos, com esse virus, sendo o mais alto título a 1 para 160 para o OXK. Esse título nunca foi ultrapassado, mesmo para os animais reinoculados várias vezes em épocas diversas da moléstia. É interessante verificar que com os animais inoculados com a raça VB, como as demais, o antígeno OXK tem grande predominância nos resultados em relação aos demais. Com o virus VA1 obtivemos uma certa percentagem de 1 para 80, tambem para o OXK no sexto dia de doença do cobáio e no rhesus. Com a raça VA2 o título mais alto alcançado foi 1 para 80, com OXK, no décimo dia de moléstia, sendo positivo em todas as inoculações dos cobáios. Com o rhesus obtivemos 1 para 160, para o OX19 e para OXL e 1 para 80, para OX2.

Em 1933 e 1935, pela primeira vez no Brasil, mostrámos a importância do cão no círculo do tifo exantemático do Brasil. O *Canis familiaris* é sem dúvida o mais importante e talvez o mais constante dos depositários do virus em Minas Gerais e quiçá no Brasil e América, estando aí a explicação dos fócos maciços familiares. Nos outros animais naturalmente infectados — "moléstia natural"

ou portadores de virus, o Weil-Felix tem sido quase sempre negativo. Já não assim no cão. Em 131 cães examinados, 127 deram resultado positivo. Os títulos mais altos foram : 1 para 1280 (OX19) e 1 para 640 (OX2-OXL-OXK). Já MARTINS, RIBEIRO & DIAS haviam tambem obtido títulos de certa altitude em cães, nos fócos da moléstia de Minas. A diferença entre o resultado das reações da moléstia experimental e natural está talvez em que os cães, ao lado de serem animais de uma resistência especial ao virus, são repetida e fortemente inoculados, nos fócos, com virus fresco. Dele, por outro lado, insulámos uma raça VB pura e nos demais sempre a raça VA1 e VA2.

Ação da glicerina

A raça de virus VB é bem conservada na glicerina de Price a 50 %, em sôro fisiológico e em baixa constante (vizinhança de 0°), no máximo até 3 semanas As raças VA1 e VA2, nestas condições, morrem em 12 dias.

Congelação

É uma técnica muito empregada no capítulo de virus, a técnica de congelação. No tifo exantemático neotrópico, no Brasil, essa técnica deu ótimos resultados. Com a raça do virus VB, desde o começo fizemos trabalhos sôbre a congelação, tendo conseguido magníficos resultados em vários sentidos, o que nos permitiu economizar numerosos cobáios e ao mesmo tempo o transporte a grande distância, para o estudo do virus. A raça VB conseguiu ser conservada no laboratório até 6 meses, produzindo ainda, no fim desse tempo, nos animais sensíveis, uma reação típica. O virus VA1, com 50 dias de congelação, havia morrido só se conseguindo resultados apreciaveis até o 10.° dia de congelação Com o virus VA2 a morte se processou no 52.° dia de congelação.

Precipitinas

O resultado das provas de precipitinas com as raças de virus brasileiros foi o seguinte :

Sôro (convalescente)		*Virus*		*Resultado*
VB	+	VB	=	1:20
VB	+	VA1 estabilizado	=	zero
VB	+	VA2 atenuado	=	zero
VB	+	VA2 estabilizado	=	1:80
VA1 estabilizado	+	VA1	=	zero
VA2 atenuado	+	VA2 atenuado	=	zero
VA2 estabilizado	+	VA2 estabilizado	=	1:160
VA2 "	+	VA2 atenuado	=	1:640
VA2 atenuado	+	VA2 estabilizado	=	1:80
VA1 estabilizado	+	VA2 "	=	zero
VA1 "	+	VA2 atenuado	=	1:160

Essas reações eram feitas tomando o sôro de animais convalescentes, adicionados ao virus de animais infectados, no 3.° ou 4.° dia de reação febril. Deduz-se deste quadro que a raça VA2, sendo a mais atenuada e antes da estabilização é que dá mais altos títulos precipitantes, principalmente quando posta em presença do anticorpo específico.

Reação de desvio do complemento

Seguimos neste capítulo a técnica de CASALS & PALACIOS. Fizemos todas as combinações possiveis entre as diversas raças de virus. Não houve desvio do complemento.

Anatomia Patológica

Não resta a menor duvida que as lesões provocadas pela raça VB são mais acentuadas e extensas que as pelas raças VA1 e VA2. Extensas e constantes. É bem verdade que as lesões do virus VA1 são as que mais se aproximam da raça VB, mas nunca atingem o grau das lesões provocadas por essa ultima raça.

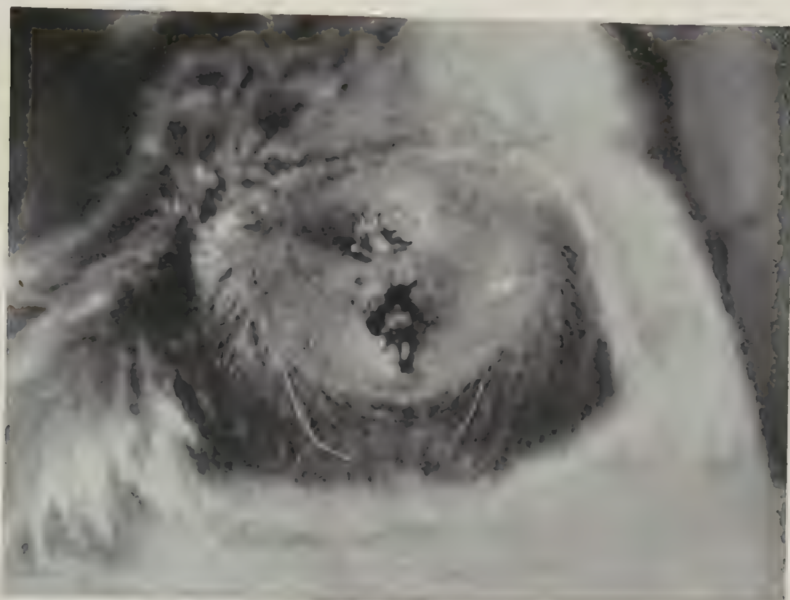


Fig. 11 — Reação testicular, virus VB.



Fig. 12 — Reação testicular, virus VA2.

A raça VA2, no período de atenuação, pode manifestar-se apenas por uma ligeira congestão do baço, mas sem um verdadeiro infarto vermelho e a infiltração de polimorfos nucleares, que se nota neste orgão, nos animais mortos pela raça VB.

Na raça VB, como na VA1, encontramos com maior intensidade uma miocardite intersticial, principalmente focal. A esplenite acima referida é acompanha-

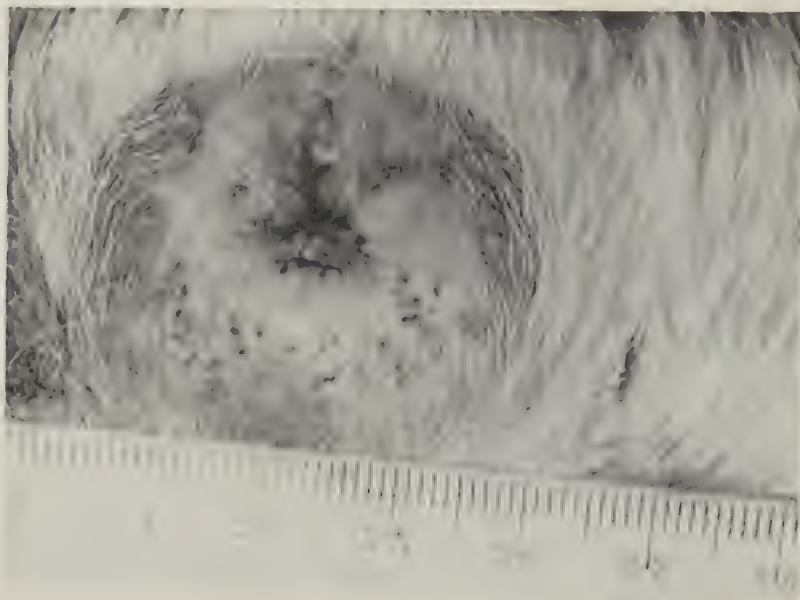


Fig. 13 — Reação testicular com exantema, virus VA1.

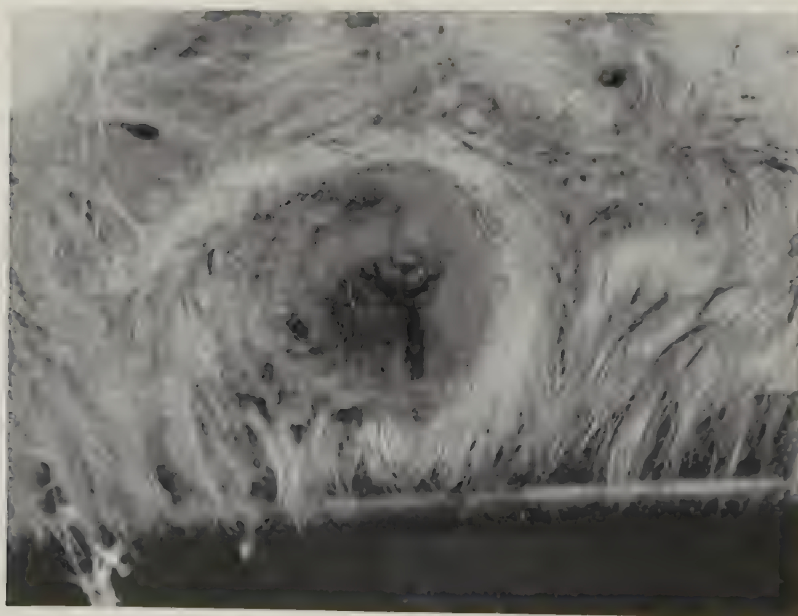


Fig. 14 — Zona de necrose da bolsa escrotal, virus VA1.

da de atrofia dos elementos linfoides e, às vezes, periesplenite. A hemorragia da polpa esplênica é intensa, havendo rutura mesmo de pequenos vasos onde mais densa é a congestão. O fígado apresenta-se congesto e com fócos de infiltração não raro, perivasculares e com proliferação do sistema retículo endotelial. Nos pulmões, o aspecto lembra o de uma pneumonia hemorrágica, com espessamento das trabéculas alveolares, que são infiltradas por monolobados, alguns polimorfos nucleares e proliferação discreta de elementos retículo-endoteliais. Há nefrite, com congestão renal e apreciavel hiperemia do encéfalo. Essas lesões são constantes, intensas e observadas exclusivamente com o virus VB.

Pesquisas de Rickettsias

A pesquisa desses elementos não serve de base segura para o diagnóstico diferencial dessas raças de virus. Com técnicas as mais variadas e rigorosas, só conseguimos, com a raça VB, 34 % de resultados positivos para Rickettsias nos animais infectados. Com a raça VA1 e VA2, essa percentagem foi mais baixa, mas sem significação.

Poder patogênico para o homem

O virus VB provoca, de regra, no homem a moléstia grave, semelhante ao que acontece aos animais. As raças VA1 e VA2 são as responsaveis pela moléstia inaparente ou benigna no homem.

Conclusões

Dentro da unidade do virus brasileiro podemos encontrar pelo menos 3 raças de virus, com propriedades distintas, inclusive o poder patogênico para o homem: Raça VB, virus clássico, brasileiro, fixo, estabilizado e raças atenuadas VA1 e VA2, do virus brasileiro. Todas as 3 raças teem numerosos pontos de contacto, inclusive os de dar reações escrotais idênticas (figs. 11-14). As raças VB e VA1 dão essa reação de um modo constante e permanente. A raça VA2, não. O seu aparecimento é cíclico. A raça VB é de um virus estabilizado no círculo vital. O virus VA1 e principalmente o VA2 são certamente de raças atenuadas, de propriedades ou inconstantes ou ainda não fixadas do virus brasileiro. A raça VB foi insulada de casos humanos graves, a maioria mortais e manteve as propriedades fundamentais desde o início inalteraveis. Insulámo-la tambem do cão, do carrapato e do gato. A raça VA1, inicialmente com algumas propriedades de VB, foi insulada do homem, de percevejos, de carrapatos, de gambás, raposas, etc., e só no fim de 10 passagens sucessivas, em animais sensiveis de laboratórios (cobáios, rhesus), no fim de 3 meses, adquiriu e fixou-se na maioria das propriedades fundamentais da raça VB. A raça VA2 foi insulada do homem, do cão e do percevejo. É uma raça mais atenuada ainda que VA1, mas que apresenta algumas propriedades da raça VB e cuja característica fundamental era ser cíclica em poder patogênico, ora muito alto, ora nulo ou quase nulo para os mesmos animais sensiveis de laboratório, nas mesmas condições de experiência. Adquiriu, porém, fixamente, a maioria das propriedades fundamentais de VB, após 18 passagens sucessivas e ininterruptas em animais de laboratório, no fim de 7 meses. As raças VA1 e VA2 do virus brasileiro são "atenuadas", mas podem, em tempo oportuno se "adaptar" e por fim se "fixar" nas propriedades da raça clássica VB.

Temos agora as bases para uma explicação razoavel das formas clínicas fulminantes, graves, benígnas e inaparentes do Tifo exantemático neotrópico no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASALS, J. & PALACIOS, R., 1941, The complement fixation test in the diagnosis of virus infections of the central nervous system, *J. Exp. Med.*, 74(5) : 409-426.

LEMOS MONTEIRO, J., FONSECA, F. & PRADO, A., 1932, Typho exanthematico de São Paulo. Os ratos como possiveis depositários do virus na natureza. *Brasil Med.*, 46(9) : 193-195.

MAGALHÃES, O., 1939, Typho exanthematico em Minas Geraes. Reações sorologicas. *Brasil Med.*, 53(10) : 325-329.

MAGALHÃES, O., 1939, Typho exanthematico em Minas Geraes. 1.ª parte. Molestia experimental. *Brasil Med.*, 53(11) : 351-362.

MAGALHÃES, O., 1941, Typho exantematico do Brasil em Minas Geraes. Provas de imunidade. Nota prévia. *Brasil Med.*, 55(5) : 67-68.

MAGALHÃES, O., 1941, Provas de imunidade cruzada do virus do tifo exantemático do Brasil. em Minas Gerais, com o de S. Paulo e da Rocky Mounted Spotted Fever (Tipo Oeste). *Arq. Neurol. Psiq.*, 3:55-70.

MAGALHÃES, O. & ROCHA, A., 1941, Tifo exantemático do Brasil (Em Minas Gerais). Estudos em focos da moléstia. Moléstia inaparente, benigna e grave. *Brasil Med.*, 55(47) :773-777.

MAXCY, K. F., 1926, Clinical observations on endemic typhus (Brill's disease) in Southern United States. *Public Health Rep.*, 41(25) : 1213-1220.

MOREIRA, J. A. & MAGALHÃES, O., 1933, Typho exanthematico em Minas Geraes, *Brasil Med.*, 47(34) : 599-601.

SALES GOMES, L., 1941, Sobre a presença do tifo exantemático, do tifo murino ou endêmico em São Paulo. Estudos de 4 casos provaveis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz,* 1(1) : 21-39.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 83-85
Março, 1943 — Rio de Janeiro. D. F.

NEOTROPICAL MIRIDAE: TWO NEW SPECIES OF "AUCHUS" DISTANT FROM BRAZIL (HEMIPTERA) [1]

HARRY H. KNIGHT and JOSÉ C. M. CARVALHO

Iowa State College, Ames, Iowa, U.S.A.

Escola Superior de Agricultura, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

The genus *Auchus* Distant (1893) was based on a single species, *foliaceus* Dist., described from Panama. This genus is remarkable for the thin, flat first and second antennal segments which elicited the specific name, *foliaceus* Distant.

In the Carnegie Museum Collection we have recognized two new species from Brazil which are herewith described. A partial redescription of *Auchus foliaceus* Distant is offered to record critical measurements.

1. *Auchus foliaceus* Distant

Biol. Cent. Amer., Rhynchota, I, pl. XXXIX, fig. 18, p. 451, 1893.

Female. Length 4.2 mm., width 1.51 mm. *Head* : width 0.91 mm., vertex 0.390 mm. Rostrum length 1.43 mm. reaching to base of hind coxae.

Antennae : segment I, length 0.73 mm., greatest width 0.43 mm., outer margin broadly arcuated, inner margin nearly straight; segment II, length 1.40 mm., width 0.53 mm., foliaceus, outer margin broadly arcuated, inner margin nearly straight, but curving near base; segment III absent.

Pronotum : length 1.04 mm., width at base 1.30 mm.; disk coarsely and rather deeply punctate. Scutellum smooth, shining, pallid, basal angles dark fuscous. Hemelytra translucent, embolium opaque yellowish; clavus (except basal angles) and inner apical angles of corium blackish; cuneus clear, apex reddish. Membrane clear, central area dark fuscous.

Redescribed from female, Aug. 13, 1934, Panama (L. J. Rozeboom).

Auchus brasiliensis n. sp.

Female. Length 4.2 mm., width 1.51 mm., *Head* : width 0.91 mm., vertex 0.346 mm., deflected in front of the eyes, the antennal sclerit relatively large and projecting; eyes removed from base, equidistant between the tylus and

[1] Received for publication January 11, 1943.

collar. Vertex with a shallow, short, longitudinal median furrow; basal carina present, reddish. Rostrum, length 1.08 mm., scarcely reaching upon middle coxae. Head yellowish castaneous, eyes dark castaneous.

Antennae : segment I, length 0.56 mm., width 0.23 mm., cylindrical, compressed laterally with a blunt ridge above and below, the outer face concave and the inner one convex, palely pilose, especially internally, attached to the head by a very slender and short peduncle which originates from a sudden basal tapering of the segment; segment II, length 1.60 mm., width 0.43 mm., foliaceous, gradually narrowed toward the apex, more suddenly constricted basally to a short cylindrical base, dark red to castaneous, moderately shining, yellowish to fuscous pilose pubescent; segment III, slender, but broken.

Pronotum : length 0.78 mm., width 0.43 mm., lateral margins rounded, posterior half of disk moderately convex, coarsely but shallowlly punctate; calli small, smooth, confluent, posterior margin slightly impressed, extending to the apical structure anteriorly; collar flat, moderately wide; clothed with yellowish pilose hairs, more heavily at the sides. Scutellum moderately convex, pilose, smooth, shining, light to dark yellowish castaneous. Sternum dark castaneous, tumid. Ostiolar peritreme present, of moderate size, protubent above the ostiole.

Hemelytra : dark castaneous to blackish; embolium yellowish, translucent, flattened, expanded, edge rather sharp; cuneus deflexed, dark castaneous, paler laterally, except the apex. Clavus and corium with erect, pale, pilose hairs; cuneus with shorter hairs. Membrane fuscous, veins dark.

Legs : yellowish, palely pilose, middle coxae contiguous with posterior pair, but far removed from the front pair. Claws strongly toothed at middle, sharply curved, arolia bristle-like and erect; evidently related to *Hyaliodes*.

Venter : moderately shining, reddish to castaneous.

Holotype : 1 female, Chapada, Brazil; collection of the Carnegie Museum. *Paratypes* : 1 male and 1 female the same locality.

Auchus bellissimus n. sp.

Differs from *A. brasiliensis* by the strongly flattened, cordiform, first antennal segment and broader second segment. The eyes are more transverse in position and set close to the pronotal collar.

Female : length 4.2 mm., width 1.65 mm. *Head* : width 0.98 mm., vertex 0.390 mm.; basal carina distinct, eyes prominent, pilose transverse in position and set close to pronotal collar; front clothed with erect pilose hairs. Rostrum length 1.51 mm., reaching to tips of posterior coxae, yellowish, darkened with reddish and brown.

Antennae : segment I, length 0.56 mm., greatest width 0.51 mm., strongly flattened, cordiform, the dorsal face with a strong median ridge from base to apex. The outer half of the segment more broadly rounded, inner edge forming nearly a straight line; segment II, length 1.52 mm., width 0.65 mm., foliaceus, outer edge broadly rounded; segment III, length 0.52 mm., very slender, clothed with erect pubescence which in length equals twice the thickness of the segment; segment IV, length 0.35 mm., slender, pilose; color reddish orange, narrow base of III and II and basal half of IV, pallid, clothed with prominent, suberect, pale pubescence.

Pronotum : length 1.03 mm., width at base 1.38 mm.; collar broad and flat, narrowed at the sides where anterior angles of pronotum appear distinct; disk broadly convex, coarsely and uniformily punctate, lateral margins distinct,

nearly straight, basal margin broadly arcuated. Scutellum moderately convex, apex rather sharp, smooth, pilose, reddish in color. Sternum dark castaneous only moderately wide; ostiolar peritreme white.

Hemelytra : yellowish to fuscous, corium subtranslucent, shining, pilose, with erect yellowish hairs; clavus fuscous, basal angles paler, shining pilose; cuneus deflected, yellowish opaque, with a reddish tinge upon inner margin or near inner apex. Membrane pale fuscous, darker basally; veins dark, yellowish near cuneus.

Venter : reddish orange, densely pilose. *Legs* : yellowish, coxae reddish castaneous; claws brownish, toothed at middle, arolia composed of two erect bristles.

Holotype : 1 female, Pará, Brazil; in the collection of the Carnegie Museum.

RESUMO

Este trabalho encerra a descrição de duas novas espécies brasileiras de *Miridae* do gênero *Auchus*, do qual até então só era conhecida a espécie tipo, *A. foliaceus* Distant, que é redescrita parcialmente.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 87-89
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

A NEW GENUS AND TWO NEW SPECIES OF NEO-TROPICAL DICYPHINAE (Hemiptera, Miridae) [1]

JOSÉ CANDIDO M. CARVALHO and CARL J. DRAKE

Escola Superior de Agricultura, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Iowa State College, Ames, Iowa, U.S.A.

This paper contains the description of a new genus and a new species of leafbug from Ecuador and a new species of *Hyaliodes* Reuter, from Trinidad, B. W. I. The types are in the Drake collection.

Knightiella, n. g.

Dicyphinae, Hyaliodini. Closely related to the genus *Hyaliodes* Reuter, but easily differentiated by the scutellum terminating apically in a stout, suberect, spine-like projection; the abruptly constricted head behind the eyes, the eyes thus being set close to pronotum. Head strongly deflected, distinctly shorter than in *Hyaliodes* and not produced behind the eyes; the eyes large, placed near the anterior margin of the pronotum, larger and placed distinctly closer together in the male than in the female. Rostrum long, reaching scarcely beyond the anterior margin of posterior coxae. Antennae inserted near the middle of the anterior margin of the eyes; first segment shorter than width of the head through the eyes; second more than twice as long as the first, third slightly shorter than the first and fourth a little longer than the first.

Pronotum strongly narrowed anteriorly, convex above, punctate, the hind margin rounded; calli distinct, shining, transverse; collar narrow, distinct. Scutellum smooth, terminating in a stout, suberect spine-like process as mentioned above. Orifice of metasternum distinct; mesoscutum not visible. Hemelytra and legs formed as in *Hyaliodes*.

Genotype : *Knightiella knighti* n. sp., from Los Banos, Ecuador.

Knightiella knighti n. sp.

Male : length 4.68 mm., width 1.70 mm. *Head* : width 0.74 mm., vertex 0.212 mm., smooth, shining, dark fuscous, behind somewhat stramineous; eyes very large, fuscous brown, vertical, the vertex a little less than the width of an eye. Rostrum length 0.70 mm., reaching scarcely beyond the anterior margin of posterior coxae, testaceous; tylus darker in color than gula.

---

1 Received for publication January 11, 1943.

Antennae : first segment length 0.53 mm., dark fuscous, lighter at base, distinctly thicker than the second, slender at base; second length 1.37 mm., blackish fuscous, slenderer, linear, rather densely clothed with pale short hairs; third length 0.50 mm., whitish in color, much slenderer, very finely and shortly pubescent; fourth length 0.74 mm., faintly thicker than third, dark fuscous, clothed with slightly longer pale hairs.

Pronotum : distinctly convex behind, punctate, dark fuscous, large spot on the disc and humeral angles yellowish testaceous; the collar and hind margin whitish; calli transverse, smooth, shining. Scutellum shining, dark fuscous, a testaceous spot before the apex, posterior half raising into a high, blunt, erect, spine-like projection. Height about equal to width of base scutellum. Sternum moderately large, testaceous, the meso- and metapleura largely dark fuscous; orifice of metasternum whitish.

Hemelytra : hyaline, clavus with a basal area within and apical fourth, a clouded area beyond the apex extending into the base of the membrane, dark fuscous.

Venter : stramineous to fuscous. *Legs* : testaceous, femora indistinctly pilose, the tibiae shortly pilose, the tarsi brownish at apices. Claws dented, arolia erect, bristle-like.

Female. Same as male, except in the following characters : Head stramineous, with a streak of each side in front, fuscous; eyes much smaller than in male, vertex nearly twice as wide as the diameter of an eye. Pronotum largely testaceous with a transverse streak behind collar and other behind calli and a rather large transverse spot near humeri on each side behind, dark fuscous, hind margin pale as in male. Hemelytra hyaline; clavus with basal area within and apex, a transverse oblique band extending from apex of embolium to near apex of clavus and a clouded area beyond the apex of clavus, dark fuscous. Membrane and veins hyaline.

Length 4.68 mm., width 1.95 mm. *Head* : width 0.74 mm., vertex 0.290 mm. Rostrum 0.70 mm. *Antennae* : first segment length 0.53 mm., second 1.27 mm., third 0.41 mm., fourth 0.74 mm. *Pronotum* : length 0.85 mm., width at base 1.14 mm.

Holotype : 1 male, Los Banos, Ecuador, July 5, 1938 (William C. McIntire). *Allotype* : 1 female from the same locality.

This very pretty, striking species is named in honor of Dr. H. H. KNIGHT, the leading American Miridologist.

Hyaliodes callani n. sp.

Female. Length 4.20 mm., width 1.50 mm. *Head* : width 0.74 mm., vertex 0.425 mm., yellowish white with a faint fuscous tinge. Rostrum length 1.06 mm., not attaining base of mesosternum, whitish, the apex embrown.

Antennae : first segment length 0.63 mm., stramineous, partly infuscated; second length 1.27 mm., testaceous, the apical and basal portions blackish; third broken, lighter in color.

Pronotum : length 0.84 mm., width at base 1.23 mm., yellowish brown, a transverse area in front of hind margin somewhat fuscous, the collar and hind margin whitish, a longitudinal median streak pale, slightly shining, punctate, clothed with very fine pale hairs. Mesoscutum short, broad, rounded behind, dark fuscous. Scutellum tumid, smooth, shining, finely clothed with pale hairs as the pronotum, a narrow basal portion not swollen, black.

Hemelytra : hyaline, the clavus with the margin along the scutellum and apex, and a transverse band formed along apex of corium and base of cuneus, becoming slightly wider within and extending narrowly to the apex of scutellum, dark fuscous, very sparsely clothed with very fine hairs, which are rather difficult to see.

Venter : entirely testaceous beneath.

Legs : pale testaceous, tips of hind femora reddish, sparsely clothed with rather long, fine hairs, tarsi partially brown, the hind pair mostly brown. Claws dented; arolia erect, bristle-like.

Holotype : 1 female, Diego Martin, Trinidad. B.W.I., Jan. 10, 1940 (E. Mc. Callan). On cassava (*Manhioc utillissima*).

SUMMARY

This paper contains the description of a new genus and two new species of neotropical *Miridae* : *Knightiella knighti* n. g. and n. sp., from Ecuador, and *Hyaliodes callani* n. sp., from Trinidad, B.W.I.

RESUMO

Este trabalho contém a descrição de um novo gênero e duas novas espécies de Mirídeos neotrópicos : *Knightiella knighti* n. g., n. sp., do Equador, e *Hyaliodes callani* n. sp., de Trinidad, B.W.I.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 91-98
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

O MIOCÁRDIO NA AVITAMINOSE E DA COBÁIA [1]

S. AMERICANO FREIRE e B. FIGUEIREDO MAGALHÃES

Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais, Brasil

(Com 6 figuras no texto)

Animais em avitaminose E apresentam "esterilidade de reabsorção" nas fêmeas, que é curavel com a administração de Vitamina E segundo EVANS (3), o que foi repetido por SALGADO & FREIRE (18), esterilidade incuravel no macho porque há degenerescência irreversivel das células germinativas dos tubos seminíferos. Nos machos aparecem "células de castração" na hipófise enquanto que nas fêmeas não se notam lesões características, nem dos ovários nem da hipófise, sendo mantidos os ciclos de ovulação.

Fora da esfera sexual e da hipófise, a avitaminose E se traduz por lesões dos músculos estriados, por vezes muito intensas, e do sistema nervoso central.

Em 1928, EVANS & BURR (4), constataram que ratos novos, filhos de fêmeas alimentadas com dieta pobre em vitamina E apresentam, cerca de 20 dias depois do nascimento, paralisia, especialmente dos membros posteriores. Esta paralisia pode ser curada com vitamina E concentrada (BLUMBERG, 1935) (2) e (KNOWLTON, HINES & BRINKHONS) (8) obtida do óleo de germe de trigo e com a vitamina E sintética ou α-tocoferol (KNOWLTON, HINES & BRINKHONS) (9).

A paralisia provocada pela avitaminose E é resultante de lesões dos músculos esqueléticos (OLCOTT, 1938) (14) e (EVANS, EMERSON & TELFORD, 1938) (5).

Constam elas de degenerescência hialina ou de Zenker das fibras musculares isoladas, tendo como consequência, perda da estriação e picnose dos núcleos. Os núcleos picnóticos, hipercorados persistem mesmo após a reabsorção e degenerescência da fibra necrótica. No início da degenerescência as fibras se mostram hipercoradas pela eosi-

[1] Recebido para publicação a 18 de Janeiro de 1943.
Trabalho apresentado à Sociedade de Biologia de Minas Gerais, em 11-3-1942.

na para depois se tornarem basófilas quando a preparação é corada pela eosina-hematoxilina.

Estas lesões são tambem encontradas no miocárdio do rato, em avitaminose E (AMERICANO FREIRE) (1) e são vistas na visinhança do

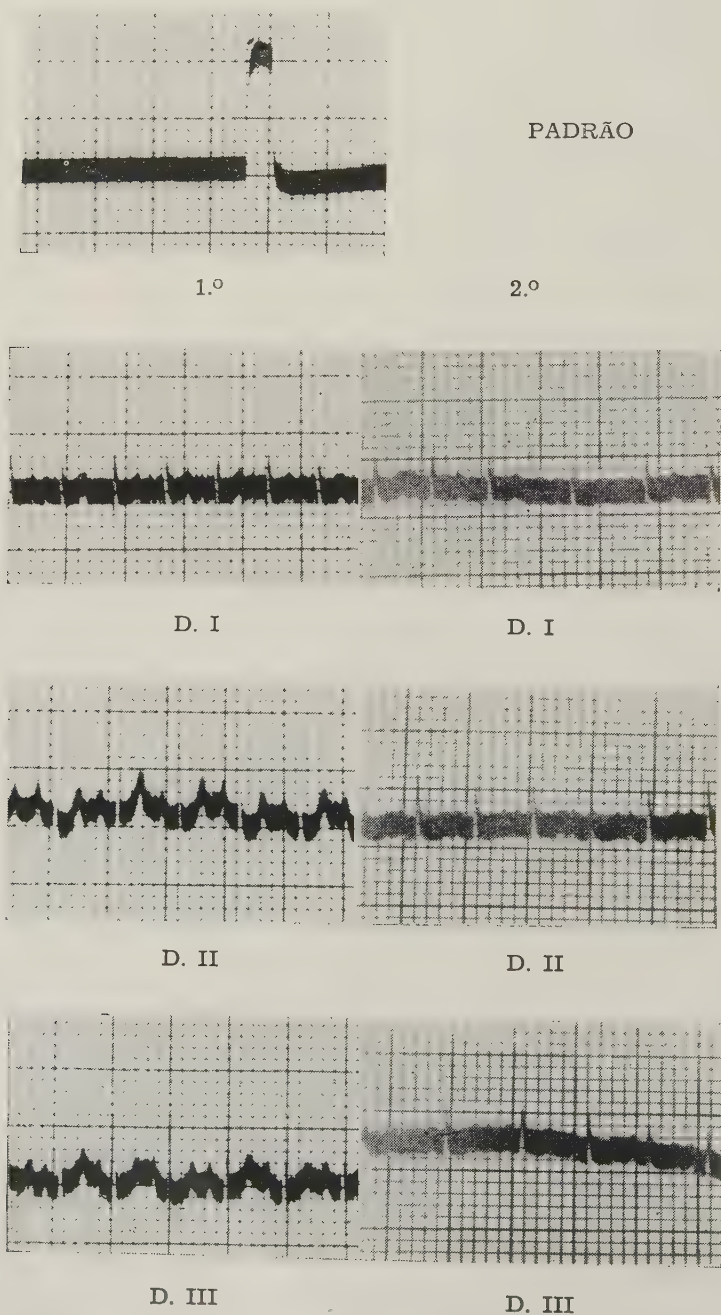
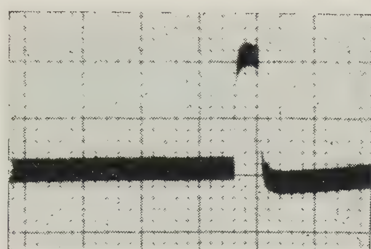


Fig. 1 — Eletrocardiograma da cobáia n.º 3.

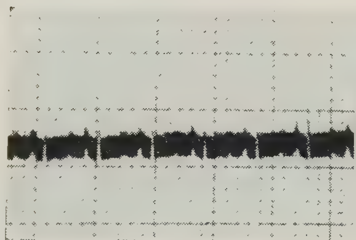
pericárdio, no miocárdio, até 2/3 de sua espessura, e em menor extensão, nas proximidades do endocárdio.

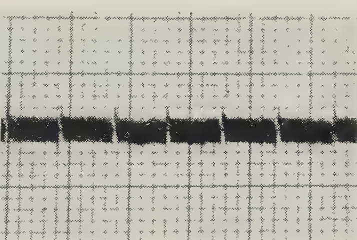
LIPPSCHUTZ, em 1936 (12), constatou degenerescência dos cordões posteriores, dos feixes vestíbulo-tecto-espinais e rubro-espinais. Com



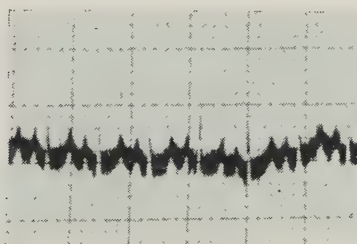
PADRÃO

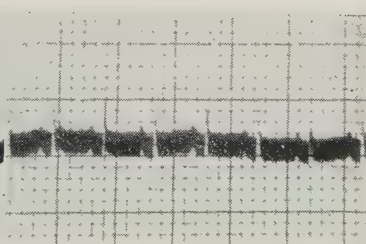
1.º 2.º



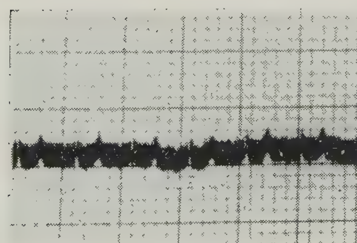


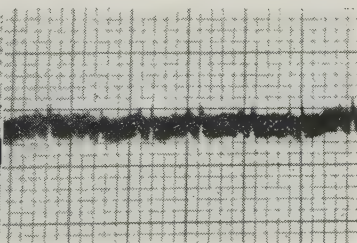
D. I D. I





D. II D. II





D. III D. III

Fig. 2 — Eletrocardiograma da cobáia n.º 4.

estes achados levantou-se a hipótese de ser a miopatia neurogênica. PAPPENHEIMER & GOETTSCH, 1940 (15), constataram que a secção do ciático impede o aparecimento da usual distrofia muscular do gastrocnêmio do rato em avitaminose E. Estes Autores admitem que este efeito pode depender da perda do influxo motor ou do influxo simpático.

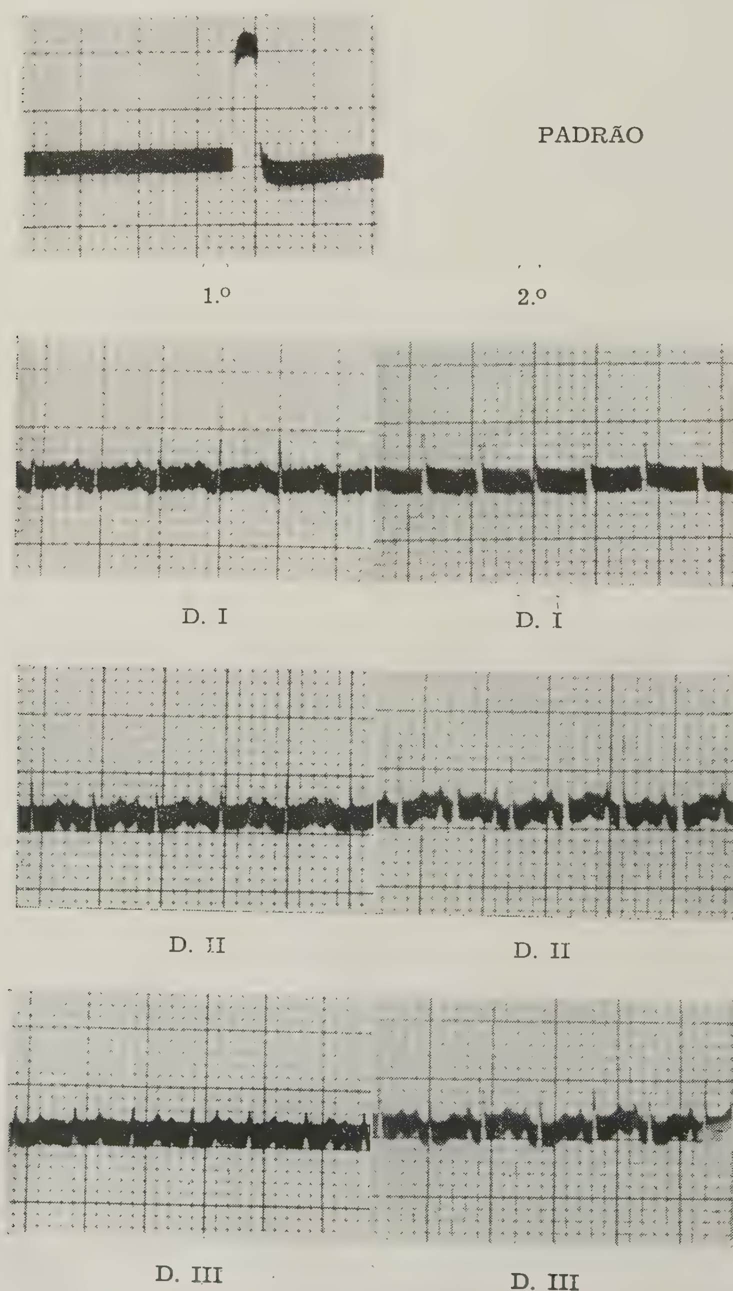


Fig. 3 — Eletrocardiograma da cobáia n.º 5.

As lesões musculares podem ser encontradas em animais sem sintomas clínicos. Com a presença de pequenas alterações histológicas as distrofias musculares podem ser evidenciadas pela diminuição do poder máximo contratil, diminuição da concentração da creatina e aumento da dos cloretos, no músculo (KNOWLTON & HINES, 1938) (10).

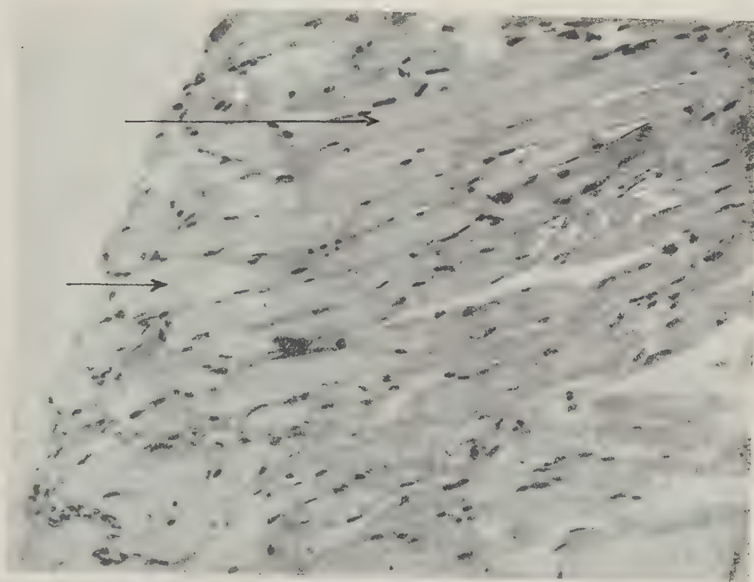


Fig. 4 — Gastrocnêmio. Fibras com necrose hialina.

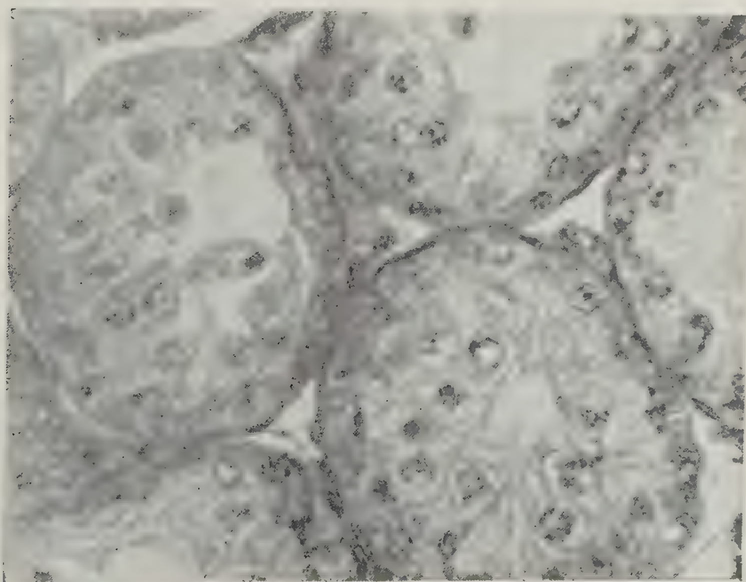


Fig. 5 — Testículo. Ausência de espermatogênese. Degenerescência do epitélio germinativo dos tubos seminíferos.

MÉTODO

Tomamos 5 cobáias com peso de 150 a 200 grs. as quais receberam a seguinte dieta (PAPPENHEIMER & GOETTSCH, 1941) (16).

Caseina (comercial	200
Sacarose	150
Amido	360
Fermento	50
Mistura de sais	40
Toucinho	80
Óleo de fígado	20
Celulose	200

A caseina foi extraida com eter etílico, para retirar alguma vitamina E nela contida. A mistura de sais empregada foi a de Osborne Mendel, segundo HAWK & BERGEIM (7).

De acordo com a indicação de PAPPENHEIMER & GOETTSCH (13) diariamente eram administrados 5 cc. de suco de tomate e 25 g. de alface. Uma das cinco cobáias recebeu, além da dieta basal uma pérola de Trigovitol [2] por dia.

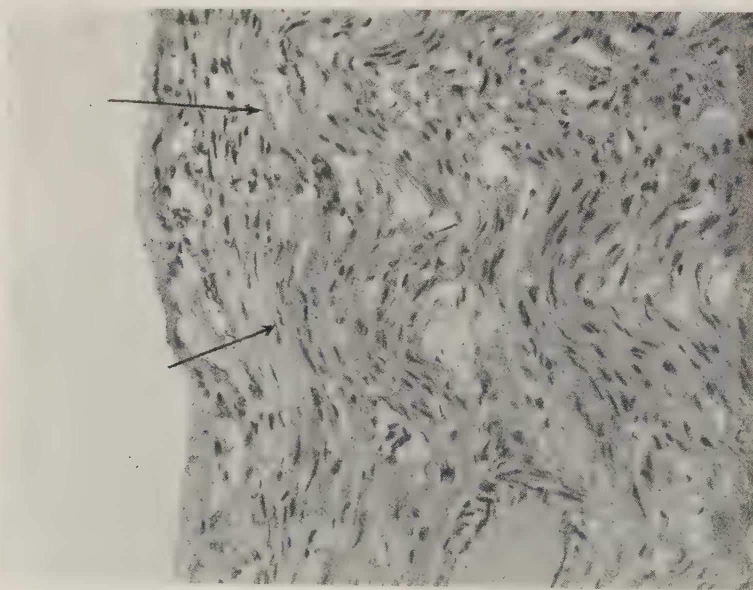


Fig. 6 — Miocárdio. Necrose hialina de fibras sub-pericárdicas.

Antes do início da experiência foi tomado o eletrocardiograma nas 3 derivações, sendo os electrodos constituidos por agulhas para injeções hipodérmicas, de niquel, que eram introduzidos subcutaneamente. Depois de 28 dias de experiência foi tomado um segundo eletrocardiograma de apenas 3 cobáias, 2 com dieta basal e 1 com dieta basal mais Trigovitol. As outras duas que recebiam dieta

[2] Trigovitol, óleo de germe de trigo dos Lab. Abbott.

basal haviam morrido tendo sido feita a necrópse para a retirada dos orgãos para o exame.

Os fragmentos do orgão foram fixados em líquido de Bouin, incluidos em parafina e depois de cortados, corados pela hematoxilina-eosina.

No presente trabalho só faremos referência às lesões do miocárdio, gastrocnêmio e testículos.

Estudamos o eletrocardiograma dos cobáios normais, o qual, apresenta grandes semelhanças com o do homem, no que diz respeito à forma e sequência dos seus acidentes. Determinando-se as durações e intensidades dos diversos componentes, veremos que, até em particularidades, como a maior duração da sístole elétrica em DII, é certa aquela afirmação, guardadas as devidas proporções.

Obtivemos de todas as cobáias que iam entrar em experiência um E.C.G. que, de acordo com a técnica e números de MAGALHÃES & ROCHA (6), nos permitiu rotulá-los de normais sob esse ponto de vista. 28 dias depois do 1.º eletrocardiograma repetimos os traçados, que passamos a examinar :

Cobáia n. 3 : Acentuada arritmia sinusal. Frequência de mais ou menos 300 batimentos por minuto. Onda P e espaço PR normais. Complexo QRS de baixa voltagem em DI, DII e DIII. Espaço ST normal. Onda T achatada nas três derivações. Interpretação : A associação — baixa voltagem de QRS e achatamento de T — nos permite concluir por um comprometimento do miocárdio ventricular (11, 13, 17) (Fig. 1).

Cobáia n. 4 : Ligeira aritmia sinusal. Frequência de 330 batimentos por minuto. Onda P e espaço PR : normais. Oscilação QRS : De baixa voltagem em DI, DII e DIII. Espaço ST : normal. Onda T : Isoelétrica em DI e DII e esboçada em DIII. Interpretação : A associação — baixa voltagem de QRS e achamento de T — nos permite concluir por um comprometimento do miocárdio ventricular (Fig. 2).

Cobáia n. 5 : E. C. G. normal (Fig. 3).

EXAME MICROSCÓPICO

Cobáia 1, *fêmea* — Morreu com 30 dias de experiência.

Miocárdio : Zonas sub-pericárdicas com fibras eosinófilas. Raras fibras com necrose hialina focal. *Gastrocnêmio* : Fibras acidófilas.

Cobáia 2, *fêmea* — Morreu com 37 dias de experiência.

Miocárdio : Necrose hialina focal de fibras sub-pericárdicas e de raras fibras sub-endocárdicas, com basofilia. Acidofilia extensa de fibras sub-endocárdicas. Edema. Veias distendidas por sangue. *Gastrocnêmio* : Fibras com necrose hialina focal e basofilia.

Cobáia 3, *macho* — Morreu com 42 dias de experiência.

Miocárdio : Extensa necrose hialina da parede ventricular sub-pericárdica e basofilia. Escassas lesões sub-endocárdicas. Edema. *Gastrocnêmio* : Fibras com necrose hialina e basofilia (Fig. 4). *Testículo* : Degenerescência dos espermatocitos e espermatogônias e conservação das células de Sertoli. As células de Leydig tambem estão conservadas (Fig. 5).

Cobáia 4 — Morreu com 42 dias de experiência.

Miocárdio — Necrose hialina focal de fibras sub-pericárdicas e basofilia. Edema. *Gastrocnêmio* : Extensas zonas de necrose hialina focal. *Testículo* : Degenerescência do epitélio germinativo dos tubos seminíferos e conservação das células de Sertoli. Conservação da glândula intersticial.

Cobáia 5, *fêmea* — Testemunha que recebeu dieta basal e óleo de germe de trigo (Trigovitol). Foi sacrificada com 52 dias de experiência. *Miocárdio* : Ausência de lesão. *Gastrocnêmio* : Ausência de lesões.

CONCLUSÕES

1. A avitaminose E produz na cobáia necrose hialina focal do miocárdio, com predominância nas fibras sub-pericárdicas, lesão esta usualmente encontrada nos músculos esqueléticos.

2. O eletrocardiograma da cobáia em avitaminose E revela comprometimento do miocárdio ventricular.

3. O extrato de germe de trigo (Trigovitol) impede o aparecimento da necrose hialina focal do miocárdio (o que foi confirmado pelo eletrocardiograma) e dos músculos esqueléticos da cobáia alimentada com dieta carente de vitamina E.

BIBLIOGRAFIA

1. AMERICANO FREIRE, S., 1941, Necrose hyalina focal do myocardio do rato em Hypovitaminose E., *Brasil Med.*, 17:308.
2. BLUMBERG, H., 1935, Growth deficiency disease, curable by wheats germ oil. *J. Biol. Chem.*, 108:227.
3. EVANS, H. M., 1932, Vitamin E. *J. Amer. Med. Ass.*, 99:469.
4. EVANS, H. M. & BURR, G. O., 1928, Development of paralysis in the Sukling young of mothers deprived of vitamin E. *J. Biol. Chem.*, 76:273.
5. EVANS, H. M., EMERSON, G. A. & TELFORD, I. R., 1938, Degeneration of cross striated musculature in vitamin E deficience. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 38:625 .
6. FIGUEIREDO MAGALHÃES, B. & ROCHA, A., 1942, O electrocardiograma do cobáio normal. *Rev. Brasil. Biol.*, 2(1) : 47-52.
7. HAWK, P. B. & BERGEIM, M. S., 1931, *Practical Physiological Chemistry*, Philadelphia, p. 680.
8. KNOWLTON, G. C., HINES, H. M. & BRINKHONS, K. M., 1938, Effect of wheat germ oil upon E. deficient muscular distrophy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 38:665.
9. KNOWLTON, G. C., HINES, H. M. & BRINKHONS, K. M., 1939, Cure and Prevention of Vitamin E. Deficient Muscular Distrophy with synthetic α - Tocopherol Acetate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 42:804.
10. KNOWLTON, G. C. & HINES, H. M., 1939, Effect of Vitamin E deficient diet upon skeletal Muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 41:453.
11. LEECH, C. E., REED, W. C. & WHITE, P. D., 1941, Low voltage of Q.R.S. waver, with special reference to lead IV. *Amer. Heart J.*, 21:551-563.
12. LIPSCHUTZ, M. D., 1936, Les voies attentes chez les jeunes rats manquant de Vitamine E. *Rev. Neurol.*, 1:221.
13. *Nomenclature and Criteria of diagnosis of diseases of the heart by the Committee of the New York Heart Association.* 4th ed., 1940. A Division of New York Tuberculosis and Health Association.
14. OLCOTT, H. S., 1938, The paralysis in the young of Vitamin E Deficiency Female rats. *J. Nutrition*, 15:221.
15. PAPPENHEIMER, A. M. & GOETTSCH, M., 1940, Effect of Nerve section upon Development of Nutritional Muscular Dystrophy in Young Rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 43:313.
16. PAPPENHEIMER, A. M. & GOETTSCH, M., 1941, Death of embryos in Guinea Pigs on Diet Low in Vitamin E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 47:268.
17. PARDEE, H. E. B., 1941, *Clinical aspects of the electrocardiogram*, 4th ed., Paul B. Hoeber, pp. 143-147 e 171-172.
18. SALGADO, C., & AMERICANO FREIRE, S., 1942, Efeitos da Avitaminose E sobre a hipófise e as gônadas do rato. *An. Brasil. Ginecol.*, 13:191.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 99-103
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

AÇÃO DOS EXTRATOS ANTITÓXICOS DO FÍGADO SÔBRE O TEOR EM GLUTÁTION HEPÁTICO NAS INTOXICAÇÕES EXPERIMENTAIS [1]

GILBERTO G. VILLELA

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

A proteção obtida pelos extratos hepáticos antitóxicos sôbre diversas intoxicações experimentais já foi por nós demonstrada amplamente em trabalhos anteriores (1, 2, 3). Na presente nota procuramos estudar a ação desses extratos sôbre o teor em substâncias redutoras do fígado expressas em glutátion total.

A ação antitóxica do glutátion, que é o composto sulfidrilado mais importante dos tecidos, foi posta em evidência desde os trabalhos de VOEGTLIN e seus colaboradores. Na defesa química do organismo, o glutátion constitue um elemento da maior importância. THOMPSON & VOEGTLIN chamaram a atenção para o papel desintoxicante deste tripeptídeo sôbre numerosas substâncias agressoras tais o arsênico, o cobre, o cianeto de sódio, o azul de metileno, etc. (4). A toxidez dos arsenicais (As_2O_3) é diminuida e mesmo abolida pela injeção de glutátion cristalizado na proporção de 10 moléculas de GSH para 1 molécula de arsênico (ROSENTHAL & VOEGTLIN) (5). Na hepatite pelo arseniato de sódio, o teôr em glutátion do fígado diminue acentuadamente, conforme verificaram BINET, WELLER & GOUDARD (6). Da mesma forma, a intoxicação pelo clorofórmio causa baixa deste tripeptídeo no fígado (GERSHOLOWITZ & CAMPBELL, BINET & WELLER). Pela injeção de neoarsfenamina em ratos (250 mg/kg) BROWN & KOLMER conseguiram tambem quéda do GSH do fígado e de outros orgãos (7).

O fígado sendo o orgão mais rico em glutátion e sendo tambem um dos mais atingidos nas intoxicações experimentais, torna-se portanto o orgão de escolha para o estudo quantitativo do grau de intoxicação.

---

[1] Recebido para publicação a 22 de Janeiro de 1943.

Em nossas experiências empregamos de preferência o camondongo, por ser este o animal que nos serviu de reativo em nossos estudos sôbre a ação dos extratos antitóxicos.

O teôr em glutátion total (GT) foi estabelecido primeiro em animais normais ou submetidos a jejum de 12 horas. A diminuição que se opera pelo jejum é pequena como tambem observaram BINET & WELLER para o coelho e o rato. Preferimos por isso englobar todas as médias normais, porque as variações se manteem proporcionais no jejum e fora dele nos animais intoxicados.

A técnica de determinação empregada foi simplificada e dósa os redutores totais expressos em GT. As variações das duas frações reduzida e oxidada do glutátion será objeto de novas investigações.

A técnica da dosagem é a que segue :

O animal é sacrificado depois de anestesiado rapidamente com eter e o fígado retirado cuidadosamente. Este orgão é limpo de suas aderências e livre da vesícula biliar, enxuto em papel de filtro para a retirada do sangue e pesado. Estas operações duram perto de 5 minutos. O tecido hepático é, então, bem triturado em gral de porcelana sob ácido tricloracético a 10 % (5 cm^3).

Fazem-se mais duas extrações com 2,5 cm^3 cada uma, filtrando-se e lavando-se o filtro com os líquidos de extração. O volume é completado para 10 cm^3 com a mesma solução de ácido tricloracético. Tomam-se 2 cm^3 do filtrado em balão de Erlenmeyer de 20 cm^3 e juntam-se 2 cm^3 de ácido sulfúrico 2N e mais 1 cm^3 da solução de iodeto de potássio 0,01 N, empregando-se a goma de amido como indicador interno. O aparecimento da côr azul persistente indica o final da reação. O volume gasto de iodato é multiplicado por 5 e por 0,31 que representa o valor em glutátion da solução de iodato. O título do iodato foi determinado com uma solução de glutátion a 200 mg para 100 cm^3 contendo 5 cm^3 de ácido sulfúrico 2 N.

O resultado foi referido para cada fígado e para 100 g. de tecido hepático, calculado pelo peso de cada fígado.

Nos animais normais encontramos para cada fígado os valores médios de 2 a 2,5 mg de GT e de 200 a 280 mg para 100 g. de tecido.

A intoxicação aguda pelo neo-arsenobenzol, neo-arsolan ou pelo arsolan determina uma baixa acentuada dos valores em GT do fígado, sobretudo quando a dose se aproxima da dose mortal. O tetracloreto de carbono mesmo em doses não mortais é capaz de fazer decrescer o GT de 40 a 50 % do normal. As doses do extrato antitóxico que protegem os animais de 60 a 70 % da dose mortal de 100 % são por si suficientes para manter o nivel do glutátion hepático. Bem que exista uma certa proporcionalidade entre a dose do tóxico e a diminuição do GT, não nos foi por enquanto possivel estabelecer uma relação definitiva.

Para cada lote de animais tornou-se mistér determinar a percentagem de morte e o valor do extrato, dada a variabilidade na resistência natural dos animais ao tóxico.

Na Tabela I resumimos os resultados por nós obtidos pela intoxicação com o tetracloreto de carbono injetado subcutaneamente. É interessante notar-se que o extrato elevou o GT mesmo quando a dose tóxica é dupla.

TABELA I

TÓXICO	DOSE CM3	GT EM MG PARA 100G DE FÍGADO		GT EM MG POR FÍGADO	N. DE ANIMAIS
		VARIAÇÕES	MÉDIAS	MÉDIAS	
Tetracloreto de Carbono	0,05	93 — 169	139	1,46	10
Tetracloreto de Carbono	0,1	98 — 124	110	1,00	10
Tetracloreto de Carbono + extrato antitóxico	0,1 0,2	86 — 135	122	1,12	10
Tetracloreto de Carbono + extrato antitóxico	0,2 0,4	98 — 305	181	1,67	10
Normais	—	169 — 256	216	2,32	15

No que respeita à intoxicação pelo arsênico (neo-arsenobenzois) os resultados são tambem muito nítidos e o extrato antitóxico que protege contra o tóxico faz igualmente elevar o GT do fígado. É o que resumimos na Tabela II.

Como os resultados com o neo-arsenobenzol (914 Bayer), o neo-arsolan (Instituto Bacteriológico do Chile) ou o oxiarsolan (chileno) são perfeitamente comparaveis levando-se em conta as doses, resolvemos juntá-los numa mesma tabela.

TABELA II

TÓXICO	DOSE EM MG	GT EM MG PARA 100 G DE FÍGADO		GT EM MG POR FÍGADO	N. DE ANIMAIS
		VARIAÇÕES	MÉDIA		
Neo-arsenobenzol	6	178 — 221	206	1,78	10
Neo-arsolan	5	211 — 259	204	1,75	12
Neo-arsolan	2	218 — 300	251	1,78	10
Neo-arsolan + extrato antitóxico	5 0,4cm³	197 — 266	229	2,55	20
Normais testemunhas	—	214 — 401	283	2,20	20

O emprego de um extrato mais ativo protege o fígado da queda do GT mesmo quando a dose do tóxico é elevada como se depreende da experiência abaixo.

TABELA III

TÓXICO	DOSE	GT EM MG POR FÍGADO	GT EM MG PARA 100 G
Oxiarsolan	12 mg	1,12 — 1,17	120 — 131
Oxiarsolan + extrato antitóxico	12 mg 0,4cm³	2,26 — 2,85	220 — 304

A dose de 12 mg de oxiarsolan é uma dose que mata de 90 a 100 % dos animais. Foi, por isso, necessário sacrificar alguns animais antes de completar o prazo de morte. Em todos os casos as análises foram sempre feitas 12 horas depois da injeção do tóxico, tanto para o tetracloreto de carbono como para os arsenicais.

Conforme mostram as tabelas acima, as variações são mais nítidas quando se considera o GT para cada fígado e não para 100 g. de fígado, porque os tóxicos fazem baixar o peso do orgão e por conseguinte aumentam o GT quando se faz o cálculo em percentagem.

Não se sabe ainda qual seja o mecanismo pelo qual o glutátion impede a intoxicação. Bem que se tenha aventado a hipótese de uma combinação direta entre o grupo SH do glutátion e a substância tóxica, o mecanismo antitóxico deve ser muito mais complexo e variado (8). Igualmente não está demonstrado que o tripeptídeo liberte glicina, ácido glutâmico e cisteina para fins de neutralização dos tóxicos como supôs Waelsch. Da mesma forma o aumento do GT no fígado do animal injetado não se deve à presença de glutátion no extrato, visto que a quantidade injetada do extrato contem cerca de 0,12 mg de GSH e o aumento observado no fígado é consideravelmente maior.

CONCLUSÕES

As intoxicações experimentais pelo tetracloreto de carbono e pelos arsenobenzois em camondongos, determinam baixa sensivel no teor de glutátion total do fígado. O emprego de extratos antitóxicos de fígado, preparados conforme a técnica por nós descrita em trabalhos anteriores, protege os animais das intoxicações e causa a normalização do conteúdo em GT do fígado dos animais injetados.

SUMMARY

Liver antitoxic extracts and liver gluthatione of intoxicated mice

The A. confirmed the fact that carbon tetrachloride and arsphenamine intoxications decreases the total gluthatione of the liver. Mice were employed and the results are based on more than 100 experiments. The mice were killed with ether and the livers removed immediately, carefully cleaned, dried with absorvent paper and weighed. The tissue was then gounded and extracted with 10 % trichloracetic acid and filtered. An aliquot part of the filtrate was employed for the determination. The extract thus prepared was titrated with 0,01 N potassium iodate in acid pH using starch as an internal indicator. The values are expressed as glutathione. A known solution of glutathione was used as reference for determining the iodate factor.

Normal values obtained from 40 mice and values for intoxicated animals as well as for protected one are summarized in the Table I.

TABELA I

	Total glutathione in mg	
	Per 100 g. of tissue averages	Per liver averages
Carbon tetrachloride	110	1.00
Carbon tetrachloride plus liver extract	181	1.67
Neo-arsphenamine (small dosages)	204	1.75
Neo-arsphenamine (toxic dosages)	125	1.15
Neo-arsphenamine plus liver extract	229	2.55
Normal mice	216	2.32

A liver extract prepared with the technic previously reported (1, 2, 3) and protecting against experimental intoxications (chloroform, carbon tetrachloride, neo-arsphenamine) was able to maintain the total gluthatione of the liver of mice injected with toxic substances (Table I and II).

BIBLIOGRAFIA

1. VILLELA, G. G., 1942, Principios antitoxicos do figado. *O Hospital*, 21(2): 201-209.

2. VILLELA, G. G., 1942, Extratos antitoxicos do figado. *Acta Med.*, 9 (3): 85-89.

3. VILLELA, G. G., 1942, Sôbre a natureza do principio antitóxico do fígado. *Rev. Brasil. Biol.*, 2(3):365-369.

4. THOMPSON, J. M., & VOEGTLIN, C., 1926, Glutathione content of normal animals. *J. Biol. Chem.*, 70:793-800.

5. ROSENTHAL, S. M. & VOEGTLIN, C., 1930, Biological and chemical studies of the relationship between arsenic and chrystaline gluthatione. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 39:347-367.

6. BINET, L., WELLER, G. & GOUDARD, H., 1937, Foie et glutation. *Presse Méd.*, 75: 1323-1325.

7. BROWN, H. & KOLMER, J. A., 1929, The relation of arsenicals to the glutathione content of animal tissues. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 35:417.

8. HARROW, B. & SHERWIN, C., 1935, Detoxication mechanisms. *Ann. Rev. Biochem.*, 4: 275-278.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 105-108
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

SÔBRE TINGITÍDEOS DO PERÚ [1]

OSCAR MONTE

Instituto Biológico, S. Paulo

(Com 2 figuras no texto)

No presente trabalho estuda-se uma pequena coleção de tingitídeos de Satipo, Perú, enviado ao autor pelo sr. P. Paprzycki. A coleção está representada por cinco espécies, duas das quais são descritas como novas.

1. *Aristobyrsa latipennis* (Champion)

10 exemplares, agosto 1942.

2. *Acanthocheila visenda* D. & H.

17 exemplares, agosto 1942. Pela primeira vez citada para esse país.

3. *Gargaphia inca* n. sp.
(Fig. 1)

Cabeça escura com 5 longos espinhos afilados e dirigidos para frente; o par anterior e o espinho mediano, escuros, muito longos, quase alcançando a extremidade do primeiro segmento antenal; o par posterior claro, com a extremidade escurecida, ligeiramente curvado para dentro e extendendo-se até a metade do espinho mediano. Antenas longas, o primeiro segmento muito comprido e escuro, três vêzes maior que o segundo; este muito curto e claro; o terceiro amarelo, muito longo e três vêzes e meia maior que o quarto; o último, escuro e coberto de delicados pêlos. Búcula larga e castanho-escura. Rostro curto, amarelo e não alcançando a nervura que estrangula a abertura rostral.

Pronoto castanho-escuro, regularmente elevado, fortemente pontuado, com minúsculas punturas. A porção triangular clara, formada de pequenas células. Vesícula alta, apertada e afilada, terminada em ponta fina. Paranotos dirigidos para cima, largos, sinuosos, formados de células largas, trisseriado na frente e bisseriado atrás. Carenas bem desenvolvidas, as laterais onduladas, estreitan-

---

[1] Recebido para publicação a 29 de Janeiro de 1943.

do-se sôbre o disco e largamente uniareoladas; a mediana bem mais alta, com forte elevação junto à vesícula e aí bisseriada, tendo a parte mais alta manchada de escuro.

Élitros alargando-se para o ápice e mais estreitados no meio. Área costal larga, cortada por três nervuras escuras e finas, com as células mais ou menos irregularmente dispostas, trisseriada até a metade e daí para diante quadrisseriada, sendo as células da metade anterior menores do que as da posterior, e com a margem costal ligeiramente serreada; área subcostal escura e quadrisseriada, sendo suas aréolas muito pequenas; área discoidal levemente escavada, piriforme, com uma pequena mancha branca na base; área sutural escura, pintalgada de aréolas esbranquiçadas.

Comprimento 3.00 mm.; largura 1.78 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e 7 parátipos, colhidos em abril 1942.

A presente espécie não se confunde com qualquer outra deste gênero. A carena mediana, muito alta, é bom característico para diferenciá-la.

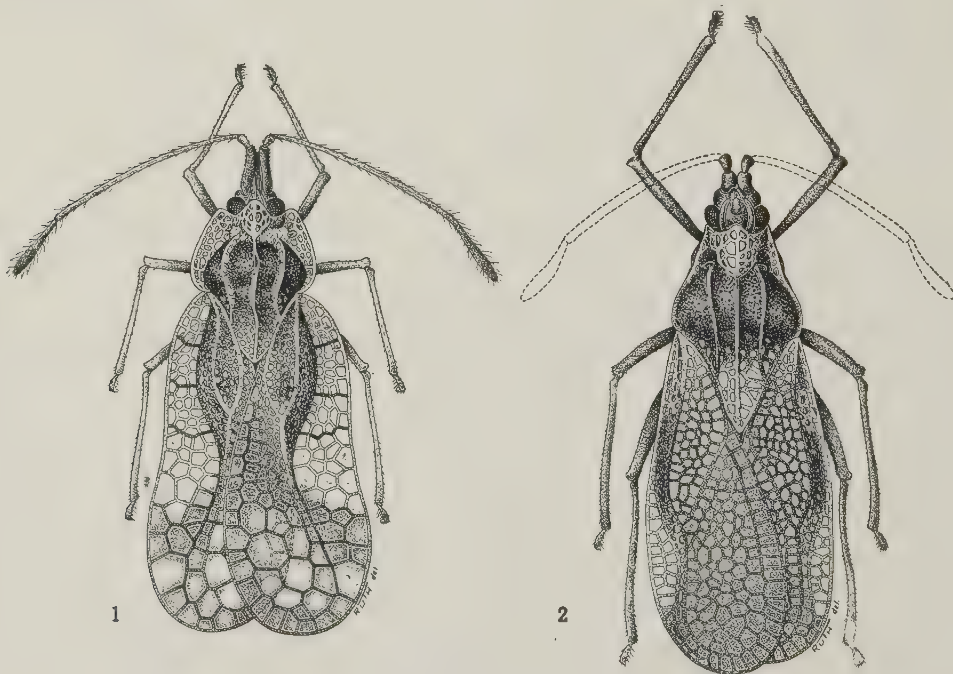


Fig. 1 — *Gargaphia inca* n. sp.; fig. 2 — *Teleonemia quechua* n. sp.

4. *Teleonemia quechua* n. sp.
(Fig. 2)

Muito semelhante à *T. picta* Champion, mas distinguindo-se desta pela área costal bisseriada na sua maior largura, pela subcostal bisseriada e mais larga que a costal na sua parte anterior.

Cabeça preta, um pouco convexa, com espinhos, os três anteriores muito curtos, os dois posteriores mais ou menos longos. O par anterior curvado para

dentro e com as extremidades tocando-se; o par posterior alongado, deitado sôbre a superfície da cabeça, pardacento, porem um pouco mais claro que os outros; o espinho mediano, curto e curvado para baixo. Antenas com os dois primeiros segmentos curtos e grossos, levemente peludos, o primeiro maior e mais grosso que o II; os III e IV artículos, quebrados. Búcula alta e escura. Rostro longo, amarelado, mas com a extremidade escura, extendendo-se até o primeiro segmento abdominal. Abertura rostral profunda.

Pronoto convexo, escuro, tricarenado, fortemente pontuado e com a porção triangular clara e formada de largas células. Carenas altas, uniareoladas, com aréolas pequenas; as laterais apertadas no meio. Vesícula alta e amarelada, mais ou menos globosa, projetada para frente. Paranotos muito estreitos, dirigidos para cima e quase ligados à superficie do pronoto, unisseriados, tendo as células da metade anterior maiores que as da posterior.

Élitros fusco-amarelados, ovalados, mais alargados para a parte posterior, arredondados no ápice. Área costal elevada até um pouco além do meio, unisseriada na frente e largamente bisseriada na sua maior largura, sendo a carreira interna formada de células maiores; a parte mediana totalmente fosca; área subcostal largamente bisseriada, quase totalmente escura; área discoidal larga, com 4-5 carreiras de aréolas na sua maior largura, aréolas e nervuras escuras, tendo a nervura que a limita com a subcostal saliente e castanho-escura, e a que a separa da sutural, amarelo-pálida; área sutural completamente escura.

Patas longas e escuras. Parte inferior do corpo pardo-escura; a parte abdominal mais clara.

Comprimento 4.56 mm.; largura 1.74 mm.

Holótipo (fêmea), colhido em agosto 1942.

5. *Teleonemia albomarginata* Champion

Agora, com a colaboração de Poor, Drake volta novamente (*An. Mus. Arg. Cienc. Nat.*, 40: 299, 1942) à questão de *Teleonemia albomarginata* Champion, considerando-a sinónimo de *Monanthia lanceolata* Walker, que os referidos autores colocaram no gênero *Teleonemia*.

Num ponto Drake & Poor já estão de acordo com meus comentarios (*Arq. Inst. Biol.*, 11:299, 1940), isto é, considerando, nos seus estudos *T. spectabilis* Drake e *T. dispersa* Drake e colocando-as na sinonímia de *T. albomarginata* Champion. Quanto à sinonímia desta última, continuamos a discordar dos citados autores, porque nada ainda se aduziu para um perfeito conhecimento da espécie de Walker. Asseveram Drake & Poor que possuem uma longa série de exemplares da Venezuela, Perú, Paraguai e Brasil e que espécimes de Venezuela concordam com a descrição original. Já dissemos em nosso citado trabalho, que existem caracteres que podem coincidir com os de *T. albomarginata,* mas não são capazes de decidir pela sinonímia. O caso de *Corythaica caestri* (Reed) é uma boa experiência quanto a colocar espécies em sinonímia sem um perfeito conhecimento do tipo, ou de elementos mais convincentes.

Sôbre a questão de reviver espécies, já externamos nosso pensamento (*Papeis Avulsos, Dep. Zool. S. Paulo,* 2: 103, 1942), quanto à inuti-

lidade de fazer ressurgir espécies cujos tipos estão perdidos e cujas diagnoses não são suficientemente convincentes para as fixar. Que se mantenha a espécie duvidosa na literatura, não sendo nunca objeto de discussão sistemática, enquanto uma circunstância qualquer não traga luzes sôbre sua identidade segura. E como nesta nova apreciação, não foram apresentados, nem discutidos elementos convincentes, *Teleonemia albomarginata* Champion, deve continuar como uma boa espécie.

No espécime agora enviado, os paranotos são totalmente deitados sôbre a superfície do pronoto, e somente na parte anterior, apresentam pequenas células na dobra.

SUMMARY

On Tingitidae from Peru

The present paper deals with a small collection of lace-bugs from Satipo, Peru, kindly sent to the writer by Mr. P. Paprzycki. The collection is represented by five species, two of which are described as new. *Teleonemia albomarginata* Champion stands as a good species.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 109-112
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

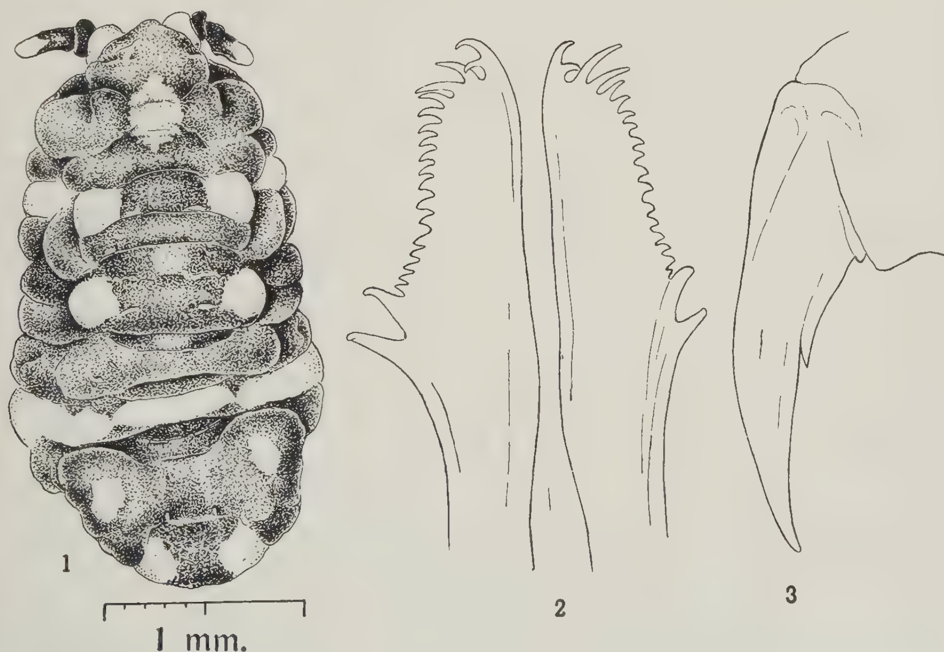
DEUX NOUVEAUX COLLEMBOLES DU BRÉSIL [1]

ROGER ARLÉ

Rio de Janeiro, D. F.

(Avec 12 figures)

Je donne dans la présente note la description de deux espèces nouvelles de Collemboles intéressantes à divers points de vue. L'une d'elles, dont je dois la connaissance à mon ami le Dr. P. WYGODZINSKY qui en a récolté trois exemplaires dans la région de l'Itatiaia, est une magnifique espèce de *Ceratrimeria* montrant sur le corps une ornementation faite de taches et bandes d'un jaune vif ce qui s'observe pour la



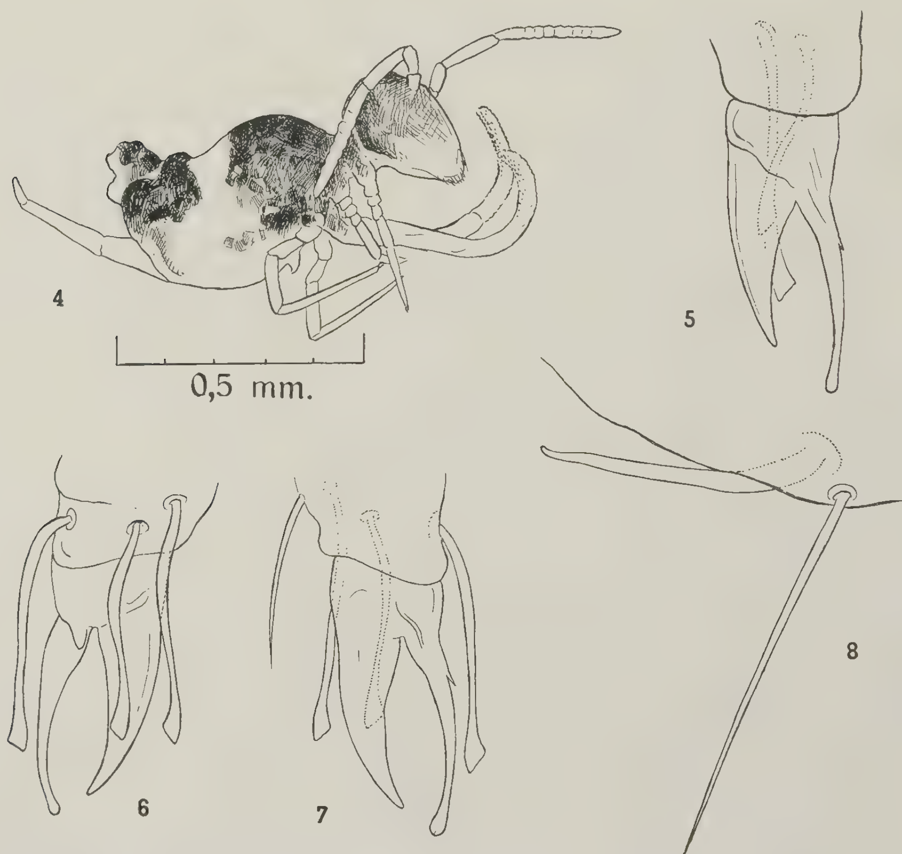
Ceratrimeria wygodzinskyi n. sp. — Fig 1: Aspect général; fig. 2: mandibule; fig. 3: griffe.

[1] Reçu le 2 Février 1943.

première fois dans le genre mais est connu chez certains *Pseudachorutes* (*P. fluminensis* Arlé, 1939). La deuxième espèce est un *Deuterosminthurus* récolté dans des broméliacées contenant de l'eau au Recreio dos Bandeirantes, Jacarépaguá, D. F., que par la constitution de ses griffes présente un intérêt tout particulier.

Ceratrimeria Wygodzinskyi n. sp.
(Figs. 1-3)

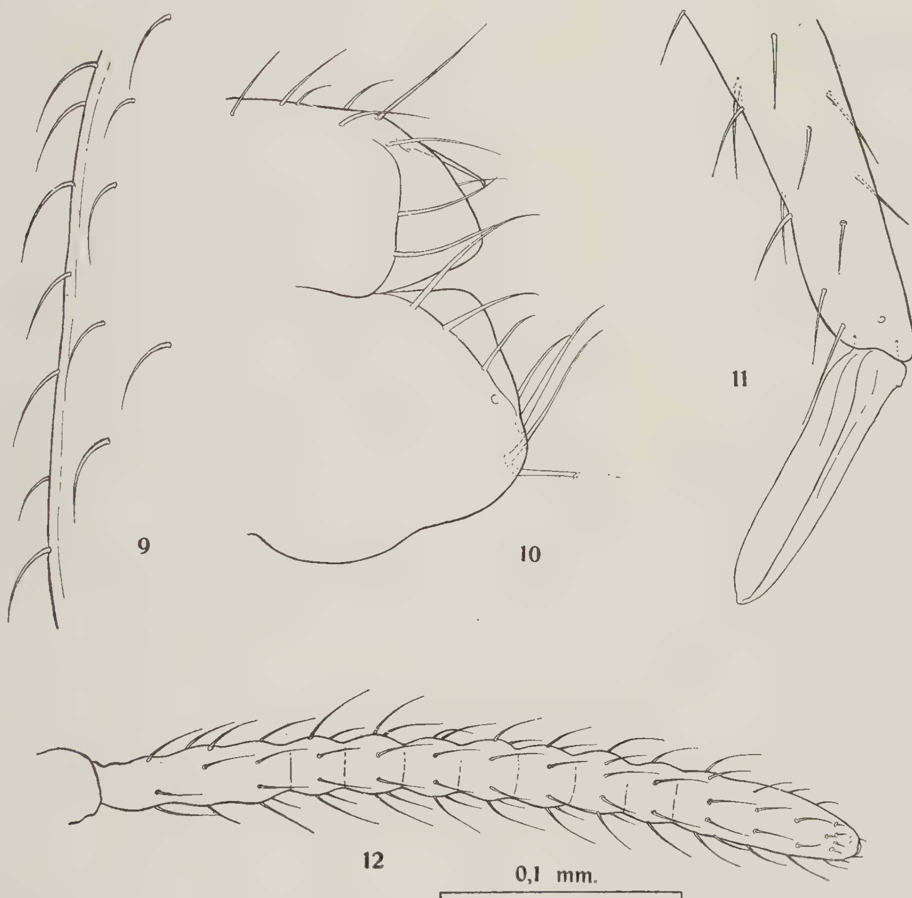
Station : Fazenda Penedo, Rezende (Itatiaia), Alt. 450 - 900 m. Mars 1942. P. Wygodzinsky col.



Deuterosminthurus separatus n. sp. — Fig. 4: Aspect de profil; fig. 5 — apex patte III; fig. 6: apex patte I; fig. 7: apex patte II; fig. 8: appendix analis.

Taille jusqu'à 3 mm. Aspect général (fig. 1). Métamérisation typique de *Ceratrimeria*, paratergites bien évidents. Coloration bleu noir, face ventrale jaune, pattes pâles légèrement teintées de violet. Ant. I jaune ainsi que l'apex d'Ant. IV. La face dorsale est ornée de dessins jaunes dont la répartition se voit sur la fig. 1. Caractères generaux comme *C. anura* Arlé, 1939. Six yeux par côté. Pas de postantennal. Griffe (fig. 3) avec une dent à la crête interne,

pas de dents latérales, pas d'ergots. Mandibules (fig. 2), bien différents de celles de *C. anura* et pourvues de 17 dents entre les deux basales et l'apicale (8 seulement chez *C. anura*). Absence complète de furca.



Deuterosminthurus separatus n. sp. — Fig. 9: Soies du grand abdominal; fig. 10: petit abdominal; fig. 11: apex de la dent et mucron; fig. 12: antenne IV.

Je laisse cette description incomplète espérant la reprendre avec un matériel plus abondant. Je crois cependant l'espèce que je propose suffisamment justifiée dans l'état de nos connaissances même si on refuse toute valeur à l'ornamentation (et dans le cas je n'y attache que peu d'importance) rien ne nous autorise a réunir deux espèces dont les mandibules sont aussi différentes. De cette façon *C. anura* et *C. wygodzinskyi* forment un groupe isolée dans le groupe III de WOMERSLEY, caracterisé par 6 yeux par côté, absence de postantennal et de furca. Le groupe IV de WOMERSLEY comprenant les anciens Anoura de LUBBOCK, insectes sans furca de la Tasmanie et Nouvelles Zélande qui ont 8 yeux par côté et un postantennal bien développé n'a rien à voir avec les espèces bresiliennes sans furca.

Deuterosminthurus separatus n. sp.
(Figs. 4-12)

Station : Jacarépaguá, Recreio dos Bandeirantes (D. F.). Bromeliacées, 22-VI-1939.

Taille de 0,7 à 1 mm. Le mâle un peu plus petit que la femelle. Coloration jaune pâle, toute la partie supérieure du corps d'un brun rouge moins une bande transversale au milieu du grand abdominal formant une ceinture pâle (fig. 4). Tête d'un brun rouge plus ou moins lavé. Antennes, pattes et furca pâles. Revêtement du corps normal. Sur la tête les soies épaissies sont faibles. Revêtement du grand abdominal formé de soies légèrement courbes (fig. 9). Soies du petit abdominal (fig. 10) plus longues que celles du grand abdominal. Je n'ai pu étudier en détail la chaetotaxie dentale, les soies sont faibles et leur répartition se rapproche de ce qu'on voit chez *D. tristani* Denis. Ant. IV montre 7 subsegments, les régions proximales et apicales insegmentés sont sensiblement égales en longueurs et valent environ 3 subsegments (fig. 12). Appendix analis courbe à la base puis droit (fig. 8). Mucrons angulés sur l'axe de la dent, ne montrant rien de particulier (fig. 11). Ergots suivant la formule P. I-II-III : 3-3-2. Griffes sans dents. Appendice empodial semblable à toutes les pattes (figs. 5-7), pourvu d'un prolongement subapical fort, renflé à la extremité et dépassant l'apex de la griffe (ceci à toutes les pattes).

Par cette dernière particularité l'espèce se sépare à la fois du groupe *bicinctus-repandus* qui possède un appendice empodial simple et court semblable à toutes les pattes et des espèces que ne montrent une conformation analogue à celle que je viens de décrire qu'à P. I, l'appendice empodial de P. II et P. III étant conformé d'une toute autre manière. En ce qui concerne cet important caractère je ne peux comparer l'espèce ici décrite avec aucun autre *Deuterosminthurus* et les figures 5-6-7 serviront de justification.

RESUMO

No presente trabalho descrevo duas espécies de Collembola :

Ceratrimeria Wygodzinskyi n. sp., desprovida de furca, que se pode distinguir de *C. anura* Arlé pela ornamentação do dorso e pela forma das mandíbulas; e *Deuterosminthurus separatus* n. sp., interessante espécie encontrada em bromélias, que, pela conformação de suas unhas, facilmente se separa de todas as demais.

TRAVAUX CITÉS

WOMERSLEY, H., 1937, On the distribution of the Collembola of the genus *Ceratrimeria* Boerner, with special reference to the Tasmaniae and New Zealand species described by Lubbock in 1899.*J. Linn. Soc. Zool.*, 40(272) : 373-382.

ARLÉ, R., 1939, Novas espécies de Pseudachorutini (Collembola) do Rio de Janeiro e arredores. *Bol. Biol., S. Paulo,* n. s. 9(1) : 67-72.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 113-117
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

"PLASMODIUM JUXTANUCLEARE", PARASITA DA GALINHA DOMÉSTICA (Notas adicionais) [1]

VALDEMAR VERSIANI e BRENO FURTADO GOMES

Belo Horizonte, Minas Gerais

(Com 15 figuras no texto)

Em publicação anterior (1) referimo-nos ao achado de um novo plasmódio aviário, parasita de galinhas, por nós identificado e descrito sob o nome de *Plasmodium juxtanucleare.*

Com a descrição desse hematozoário, eleva-se a sete o número de plasmódios aviários de ocorrência verificada no Brasil. Até o presente, aliás, tem sido pequena e dispersa a contribuição nacional a este estudo. O único trabalho sistematizado com que contamos e o de LUCENA (2), que identificou seis espécies em aves do Estado de São Paulo. MARTINS & VERSIANI têm em andamento pesquisas análogas ainda inéditas, no Estado de Minas Gerais, sendo ainda pequeno o acervo de observações que possuem. Não temos conhecimento de outros trabalhos atualmente em curso no país.

Recentemente BELTRÁN (3) encontrou em galinhas do Estado de Chiapas, no México, um plasmódio que muito se aproximava da espécie descrita por nós. Mediante estudo comparativo com preparações que lhe remetemos, esse autor concluiu tratar-se realmente do mesmo parasita. Deste modo, a presença do *P. juxtanucleare* em dois pontos tão afastados do mesmo Continente permite supôr seja ele amplamente disseminado na América; acreditamos que ulteriores pesquisas venham confirmar esta suposição, analogamente ao que se tem dado com a maioria dos outros plasmódios de aves.

Revelando o achado do *P. gallinaceum* nas Filipinas, AFRICA, DY & SORIANO (4) aludem a outra espécie tambem por eles alí observada, da qual todavia não apresentam nenhuma descrição. É possivel que se trate do *P. juxtanucleare,* como nota BELTRÁN, porém a questão só po-

[1] Recebido para publicação a 8 de Fevereiro de 1943.

derá ser esclarecida depois de restabelecidas as comunicações com aquelas ilhas.

Como acentuámos em trabalho anterior, é muito elevada a mortalidade entre os animais inoculados. Não possuimos dados suficientes para ajuizar da duração da infecção natural; supomos que pelo menos os animais adultos resistam bastante tempo, pois que uma das duas galinhas que encontrámos naturalmente infectadas alcançou vinte meses de sobrevivência. Nas infecções experimentais observa-se um índice de mortalidade acima de 96 %, sendo entretanto muito variavel o tempo de sobrevida, que foi de quinze dias a nove meses. Predominou a mortalidade nos dois primeiros meses, em que se elevou à cifra de 68 %. Os animais adultos resistem por mais tempo à infecção, porém entre as aves jovens observámos que mais de 75 % sucumbem dentro dos dois meses subsequentes à inoculação.

As aves utilizadas têm sido ordinariamente galinhas mestiças comuns, além de alguns exemplares de raças Leghorn, Japonesa e Combatente. Não se notou diferença sensivel na marcha da infecção entre as galinhas de raça Japonesa; em todas elas, num total de cinco, a morte sobreveiu entre um e três meses. Quanto às ds raça Leghorn e Combatente, o pequeno número de animais utilizados não permite apreciações. Conseguimos tambem a infecção de um perú adulto, que sobreviveu três meses e meio.

Durante um período mais ou menos prolongado não se observa nenhum sintoma nos animais inoculados, e neste caso, via de regra, mantém-se relativamente baixo o nivel de parasitas no sangue circulante. Sobrevem depois emagrecimento progressivo, que por vezes se torna bastante acentuado e se acompanha de anemia ordinariamente muito intensa, com grande hipocromia das hemátias, algumas destas apresentando granulações basófilas para as quais CARINI (5) ultimamente chamou a atenção. São tambem comuns as manifestações diarréicas. Nos últimos dias, as aves se mostram tristes e abatidas, locomovendo-se com dificuldade. Não surpreendemos nenhuma ascenção térmica em qualquer período da moléstia, semelhantemente ao que notou BRUMPT nas infecções pelo *P. gallinaceum* (6).

Embora ainda não haja sido feito estudo detalhado das alterações anátomo-patológicas, chamou-nos logo a atenção a presença habitual de derrame pericárdico nas aves autopsiadas, assim como a grande deposição de pigmento em diversos orgãos. Não têm sido encontradas fórmas exoeritrocitárias, em pesquisas efetuadas por LOBATO (informações pessoais) e por nós.

O número de hemátias parasitadas eleva-se bastante nos casos severos de infecção experimental. Em uma de nossas preparações (fig. 1) contámos 5.984 eritrocitos parasitados entre 10.000 elementos. Nesse caso havia grande número de células multiparasitadas, che-

gando o número de parasitas a 2.248 em uma contagem de 2.000 hemátias.

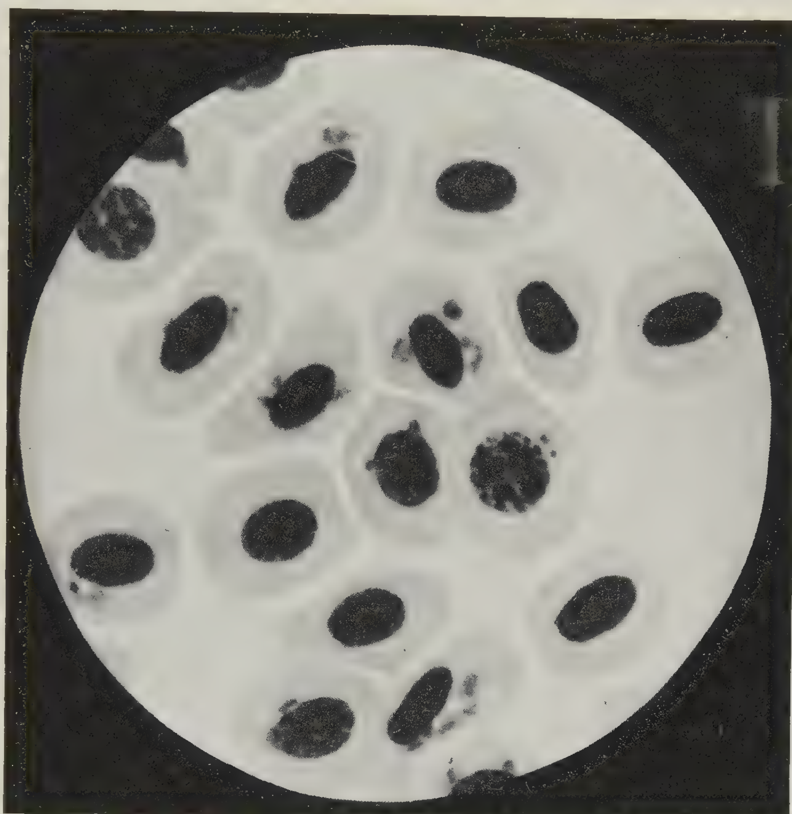
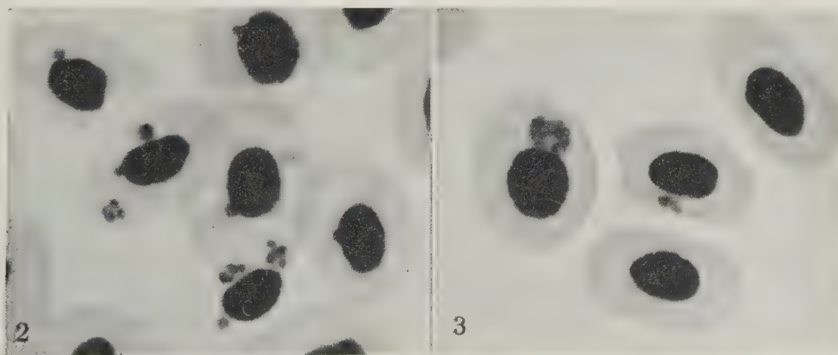


Fig. 1 — *Plasmodium juxtanucleare*, hemátias multiparasitadas, 2200 xx.

Não se nota predileção do parasita pelos tipos mais jovens de hemátias (tipos I e II de HEGNER & ESKRIDGE) (7), contrariamente ao que



Plasmodium juxtanucleare — Fig. 2: Trofozoitos e rosáceas; fig 3: trofozoitos e gametocito feminino, 2200 xx.

foi observado por HEWITT (8) e colaboradores em relação a outros plasmódios aviários. Em trabalho ulterior nos ocuparemos mais pormenorizadamente desta questão.



Plasmodium juxtanucleare — Figs. 4-8 : Trofozoitos; figs. 9-10 : formas pre-segmentares; figs. 11-13 : rosáceas; fig. 14 : gametocito masculino; fig. 15 : gametocito feminino.

Achando-nos atualmente em condições deficientes de trabalho, ainda não pudemos determinar a duração do ciclo assexuado, assim como prosseguir na pesquisa de espécies transmissoras. A respeito deste último problema, podemos referir as experiências de LOBATO (informações pessoais), que não conseguiu infectar o *Culex quinquefasciatus* e o *Aedes aegypti*. Em pequeno número de tentativas realizadas no antigo Instituto Biológico Ezequiel Dias, NORONHA PERES & FURTADO GOMES (dados inéditos) igualmente não obtiveram transmissão pelo *C. quinquefasciatus*, que recentemente VARGAS & BELTRÁN (9) verificaram ser um dos vetores do *P. gallinaceum*.

Apresentamos alguns desenhos em câmara clara e microfotografias, reportando-nos aos detalhes citológicos descritos em nossa primeira publicação.

Os desenhos se devem à gentileza do distinto colega Dr. Abdon Hermeto, a quem consignamos aquí os nossos agradecimentos.

SUMMARY

Additional notes are given about an avian *Plasmodium* found in fowls in the State of Minas Gerais, Brazil, described by the authors in a former paper and lately found also in Mexico. The authors present data on symptomatology of the experimental infection.

REFERÊNCIAS

1. VERSIANI, V. & FURTADO GOMES, B., 1941, Sôbre um novo hematozoário da galinha — *Plasmodium juxtanucleare* n. sp. (Nota prévia). *Rev. Brasil. Biol.*, 1(2):231-233.

2. LUCENA, D. T., 1939, *Malária aviária — Subsídios para suas sistemática e transmissão*. Oficinas gráf. do Jornal do Comércio, Recife.

3. BELTRÁN, E., 1941, Hallazgo de *Plasmodium juxtanucleare* Versiani y Furtado en gallinas de Chiapas. *Rev. Inst. Salub. y Enf. Trop.*, 2(3-4):353-354.

4. AFRICA, C. M., DY, F. J. & SORIANO, L. J., 1940, A study on the identity of a Plasmodium in the Philippines domestic fowl (*Gallus gallus*). *Nat. & App. Sci. Bull. Univ. Phil.*, 7:279-289 (Cit. por BELTRÁN).

5. CARINI, A., 1942, Corpúsculos endoglobulares encontrados em animais do Brasil. *Arq. Biol.*, 26(252):1-5.

6. BRUMPT, E., 1936, Étude expérimentale du *Plasmodium gallinaceum* parasite de la poule domestique. Transmission de ce germe par *Stegomyia fasciata* et *Stegomyia albopicta*. *Ann. Parasit. Hum. et Comp.*, 14(6):597-620.

7. HEGNER, R. & ESKRIDGE, L., 1938, Susceptibility of young red cells to the merozoites of avian plasmodia. *Amer. J. Hyg.*, 27:471-492.

8. HEWITT, R., 1940, *Bird Malaria*. The Johns Hopkins Press, Baltimore.

9. VARGAS, L. & BELTRÁN, E., 1941, *Culex quinquefasciatus*, a new vector of *Plasmodium gallinaceum*. *Science*, 94(2443):389-390.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 119-125
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

NOVO MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO DA GRAVIDEZ BASEADO NA DETERMINAÇÃO QUÍMICA DO HORMÔNIO GONADOTRÓPICO DA URINA [1]

MARIA ISABEL MELLO

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

A preocupação de diagnosticar a gravidez, logo no seu início, tem levado grande número de investigadores a procurar um método capaz de dar com precisão e rapidez uma resposta satisfatória.

Inúmeros tests biológicos, alérgicos, químicos, etc., têm sido propostos. Entre os químicos citaremos o de VOGE (1) baseado na hiperhistidinúria da gravidez, o de VISSCHER & BOWMAN (2) que determina o poder de redução da urina gravídica, o da eliminação do ácido hipúrico, proposto por HIRSCHEIMER (3), o da atividade di-amino oxidásica do sôro gravídico, estudado por ZELLER (4), etc. Ao lado destes colocaremos os tests químicos de origem hormonal, por isso mesmo mais específicos. Assim temos, a determinação do glicuronato pregnandiol sódico, realizado por VENNING (5) e o da avaliação do poder óxido-redutor do hormônio gonadotrópico da urina gravídica, apresentado por BOWMAN (6) e por nós modificado (7) os quais oferecem resultados com uma precisão de 96 a 98,4 %.

Porém, estas últimas técnicas são quase impraticaveis nos laboratórios clínicos, já pelo tempo que consomem, já pelo material dispendioso de que necessitam.

Em nota anterior (8) comunicámos em traços gerais, uma técnica química, por nós elaborada e com a qual obtivemos resultados muito satisfatórios. Nela o diagnóstico da gravidez era estabelecido pela quantidade de tiosulfato gasta.

O método químico que propomos no presente trabalho é baseado na técnica de preparação do hormônio gonadotrópico da urina gravídica, preconizada por SCOTT (9) e nas propriedades óxido-redutoras desse

---

[1] Recebido para publicação a 8 de Fevereiro de 1943.
Trabalho do Laboratório de Bioquímica do Instituto Oswaldo Cruz (Chefe : G. G. VILLELA), apresentado ao 2.º Congresso Brasileiro de Química em Curitiba (Janeiro de 1943).

hormônio. Estas propriedades foram minuciosamente estudadas por Bowman (10), Gurin, Bachman & Wilson (11, 12), Gurin (13) e por nós consideradas em trabalhos anteriores (7, 8). Conhecidos os valores para excreção do hormônio gonadotrópico em pessoas normais e grávidas, e havendo verificado que a redução do eluato é proporcional à quantidade de hormônio que contém, procurámos relacionar o número de ml. de tiosulfato consumidos com a unidade biológica. Os resultados expressos em unidades biológicas, podem servir como guia diagnóstico nos casos em que há suspeita de alguma anormalidade.

Conseguimos, assim, uma técnica precisa e com vantagens sôbre as já existentes pela simplicidade de execução, rapidez, facilidade de reativos, além da precocidade de diagnóstico que se pode estabelecer logo nos primeiros dias. Em 197 casos por nós estudados tivemos apenas um sem confirmação clínica.

Princípio do método — A urina gravídica, que já na primeira semana contém hormônios gonadotrópicos em quantidade aumentada, é acidificada até pH 4.0, ponto isoelétrico do hormônio. Este é adsorvido pelo kaolin, enquanto as outras substâncias redutoras presentes na urina permanecem no líquido. O gonadotrópico é eluido do adsorbato pelo hidróxido de sódio 0.1 N. A emulsão alcalina é centrifugada e o eluato tratado pelo reagente de Somogyi (14) e titulado pelo tiosulfato. Os valores encontrados pela titulação são convertidos em unidades camondongas.

Reagentes necessários — : 1 — Solução de kaolin 20 % (o kaolin B.D.H. e o "Bolus alba" em pó para uso medicinal, segundo Prof. Stumpf, Merck, são os que melhor adsorvem o hormônio).

2 — Ácido acético glacial.

3 — Indicador universal (Merck).

4 — Solução de ácido clorhídrico diluido (1 ml. da solução de HCl 0.01N em 100 ml. de água distilada).

5 — Solução de soda 0,1N.

6 — Reagente cúprico Somogyi 1937 (Dissolvem-se num balão de litro 25 gr de carbonato de sódio anhidro e 25 gr de sal de Rochelle em 800 ml. de água distilada. Introduz-se agitando o balão, 40 ml. de sulfato de cobre a 10 %. Adicionam-se 20 gr de bicarbonato de sódio, 200 gr de sulfato de sódio e 1,5 gr de iodeto de potássio. Aquece-se a solução até a fervura e deixa-se ferver por 30 segundos. Esfria-se, filtra-se si necessário e adicionam-se 6 ml de iodato de potássio N. Completa-se o volume para 1000 ml.).

7 — Solução de iodeto/iodato (Dissolvem-se em um balão de litro 25 gr de iodeto de potássio e 25 gr de oxalato de potássio com um pouco de água distilada; completa-se o volume).

8 — Solução de ácido sulfúrico N.

9 — Solução de tiosulfato de sódio 0.005N (Prepara-se diariamente a solução partindo da solução-mãe 0,1N).

10 — Solução de amido 1 %.

(Os reativos são os mesmos empregados na técnica para dosagem da glicose no sangue) (17).

Técnica — : *a*) — Verifica-se a densidade da urina que se vai examinar e que de preferência deve ser a da primeira micção. Acidifica-se com ácido acético glacial até pH 4.0.

b) — Em um tubo de centrifugação tomam-se 10 ml. da urina acidificada aos quais se adicionam 5 ml. da suspensão de kaolin previamente agitada.

c) — Mistura-se a solução no tubo até ficar bem homogênea.

d) — Durante 15 minutos o tubo é agitado 2 ou 3 vêses para que a adsorção seja total.

e) — Centrifuga-se 10 minutos, com 3.000 r.p.m.

f) — Decanta-se o líquido (se a urina contiver albumina, lava-se o precipitado com 10 ml. da solução diluida de HCl e centrifuga-se outra vez).

g) — Elúe-se o precipitado em 10 ml. de soda 0.1N.

h) — Em um tubo Pyrex, pipetam-se cuidadosamente 1 ml. do eluato (1 ml. do eluato corresponde a 1 ml. da urina) e 5 ml. do reagente cúprico. Obtura-se o tubo para evitar a re-oxidação.

i) — Em outro tubo T, no qual se determinará a quantidade de agente oxidante empregada, pipetam-se exatamente 1 ml. de água distilada e 5 ml. do reagente cúprico. É importante o uso de pipeta volumétrica, e preferivelmente a mesma pipeta, para medida da solução cúprica. Veda-se o tubo como acima.

j) — Colocam-se os tubos em suporte de metal, imersos no banho maria fervente, onde ficam 30 minutos.

k) — Os tubos são retirados do banho no suporte e esfriados por imersão em água até mais ou menos 30° C.

l) — Pipetam-se em cada tubo, com pipeta volumétrica 2 ml. da solução iodeto/iodato.

m) — Juntam-se lentamente, 5 ml. da solução de ácido sulfúrico, e agita-se um pouco o tubo para completa dissolução do óxido cuproso formado.

n) — Titula-se pelo tiosulfato 0.005N até o aparecimento de uma côr ligeiramente amarelada devido ao iodo. Adicionam-se duas a três gotas da solução de amido e continua-se a titulação até o desaparecimento da côr azul característica do complexo iodo/amido. O líquido no final da titulação apresenta uma côr ligeiramente esverdeada devido a presença do cobre.

Cálculo —

$$\frac{(\text{ml. tiosulfato gastos tubo T} - \text{ml. tiosulfato gastos amostra}) \times 1000}{5} = \text{U.C por litro}$$

O número de ml. de tiosulfato gastos com o tubo T, dá a quantidade de agente oxidante empregado. Subtrai-se deste número os ml. gastos com o eluato; a diferença obtida corresponde a quantidade de substância redutora presente na amostra. Como demonstraremos mais adiante, 5 ml. correspondem a uma unidade camondonga. Assim, o número de ml. de tiosulfato é dividido por 5 e multiplicado por 1.000, tendo-se o resultado expresso em U.C. por litro de urina. O valor mínimo, por nós encontrado em 197 casos dosados quimicamente foi de 320 U.C. por lt. e o máximo de 260.000 U.C. Dos valores encontrados, 23 foram controlados pela técnica de ASCHEIM & ZONDEK sendo perfeita a concordância dos tests químico e biológico.

EXPERIMENTAÇÃO

Obtenção do hormônio gonadotrópico — As técnicas químicas para obtenção do hormônio gonadotrópico de pequenas quantidades de urina são, na sua maioria, demoradas e dispendiosas. A precipitação pelo álcool preconizada por HELLER & HELLER (15) pelo ácido benzóico, por KATZMANN & DOISY (16), pelo ácido túngstico apresentada por FREED & HECHTER (17), pelo álcool/eter, ácido tânico, ácido tânico/piridina, piridina, carvão, pela acetona como na técnica de

BOWMAN, requer mais tempo e maior quantidade de material, advindo daí a vantagem na precipitação do hormônio pelo kaolin como na técnica de SCOTT.

Experimentando várias técnicas de extração do hormônio, escolhemos a do kaolin, por ser mais rápida, menos dispendiosa e extrair quantitativamente o hormônio.

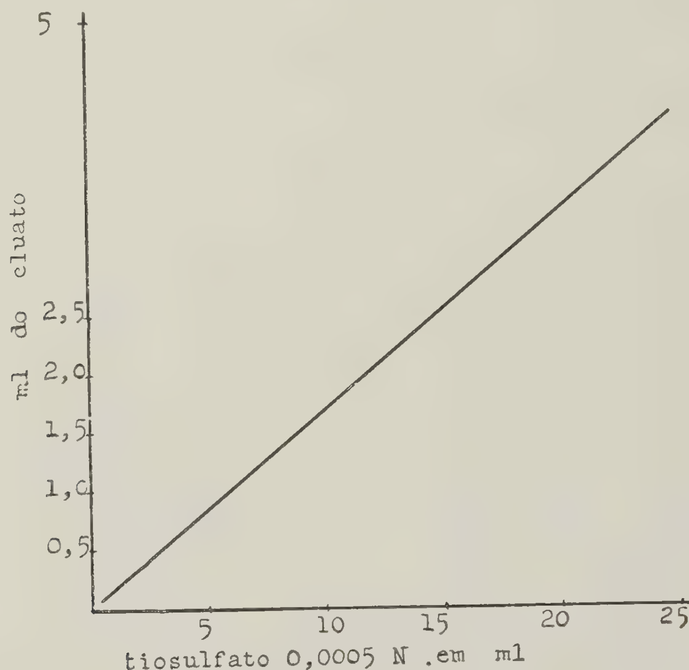


Fig. 1 — Relação entre o hormônio presente no eluato e o tiosulfato gasto.

Quantidade de kaolin — Foram feitas várias determinações do hormônio gonadotrópico empregando-se quantidades diferentes de kaolin. Os eluatos obtidos bem como amostras do hormônio puro, foram dosados química e biologicamente; verificou-se perfeita concordância entre a resposta pelo test biológico e os resultados obtidos, pela técnica química quando o hormônio foi adsorvido em 5 ml. da solução de kaolin a 20 %.

Curva de adsórção do hormônio gonadotrópico (1ml. = 10 U.C.) pelo kaolin

SOLUÇÃO CONTENDO 10 U. C/ML.	QUANTIDADE DE KAOLIN	TEMPO DE ADSORÇÃO	ML. GASTOS TIOSULFATO 0.005N
10 ml.	1 ml.	15′	25,9
10 ml.	2 ml.	15′	34,3
10 ml.	3 ml.	15′	37,3
10 ml.	4 ml.	15′	41,7
10 ml.	5 ml.	15′	50,3
10 ml.	10 ml.	15′	50,2
1 ml.	—	—	50,3

Escolha do agente oxidante — Foram ensaiados vários agentes oxidantes com o eluato. O reagente cúprico de Somogyi foi o adotado por oferecer menores

causas de erro. Devido a elevada concentração de sulfato de sódio, diminue a reoxidação pelo ar, dando valores mais precisos. Além disto, os reativos são os mesmos empregados para a dosagem da glicose no sangue, o que torna mais facil o seu uso nos laboratórios clínicos.

Tempo de adsorção e aquecimento — O tempo de adsorção do hormônio gonadotrópico da urina pelo kaolin foi determinado tratando-se uma solução contendo quantidade conhecida de hormônio, com 5 ml. de kaolin. Os tempos para adsorção foram de 5, 10, 15, 30 minutos. A adsorção em 15 minutos foi a que ofereceu o melhor resultado. As titulações foram feitas em amostras aquecidas em banho maria fervente por 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 minutos. Os valores obtidos com 30 minutos de aquecimento foram os mais altos.

Conservação da urina ou do eluato — A urina acidificada, e na geladeira, conserva o hormônio gonadotrópico até 5 dias sem alteração. A urina de 7 dias dá valores mais baixos. O eluato na geladeira conserva o hormônio até duas semanas.

Atividade biológica do eluato — A urina tratada pelo kaolin e eluida em soda, foi ligeiramente acidificada (pH 6.0), e injetada em camondongas infantis, em doses crescentes. O mesmo foi feito usando a urina em natureza, apenas desintoxicada pelo eter. As respostas obtidas com o eluato injetado na mesma dose da urina, foram muito mais fortes, o que se atribue à maior concentração do hormônio.

Redução do hormônio — Tomámos quantidades crescentes de um eluato contendo hormônio gonadotrópico, que tratámos igualmente para verificar se a redução era proporcional à quantidade ou sofria alguma alteração quando empregada em quantidade mais elevada.

O número de ml. gastos de solução de tiosulfato 0,005N com as concentrações empregadas serviram para a construção do gráfico abaixo (fig. 2).

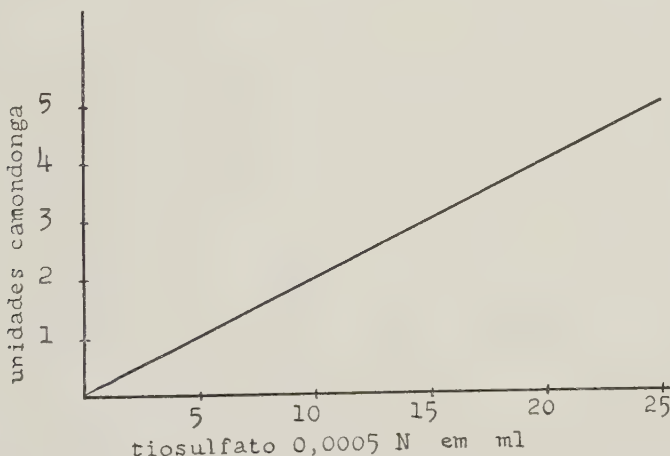


Fig. 2 — Relação entre o tiosulfato gasto e a quantidade de hormônio gonadotrópico coriônico padronizado biologicamente. 1 ml = 1 unidade camondonga.

ESPECIFICIDADE DO MÉTODO

A presença dos hormônios gonadotrópicos nos eluatos de kaolin, foi comprovada biologicamente. Usámos os "tests" de Ascheim e de Friedman. Injetámos os eluatos obtidos e a urina em natureza. As respostas obtidas com os eluatos foram sempre mais acentuadas o que se atribue à maior concentração do

hormônio. Fizemos 534 determinações, em 197 casos de gravidês, 31 urinas de mulheres não grávidas e de 10 homens normais.

Controlámos os valores encontrados pela nossa técnica química e expressos em unidades biológicas fazendo determinações biológicas com as mesmas concentrações de extrato. A diferença entre as respostas biológicas e químicas não se afastou de 4,5 %. O número de casos controlados foi de 23.

Como se pode verificar, o afastamento é praticamente nulo nos casos em que existe eliminação elevada do hormônio gonadotrópico, como acontece na gravidês. Sendo assim, o número de ml. do tiosulfato consumido pela amostra e transformado em unidades camondonga, pode servir com vantagem, no diagnóstico dos casos em que há suspeita de alguma anormalidade.

Os resultados obtidos com o nosso test químico, foram sempre confirmados clinicamente.

SUMMARY

New method for the diagnosis of pregnancy based on the determination of the gonadotropic hormone of the urine

The reducing properties of the urine gonadotropic hormone were studied and a technic was worked out which is based on the adsorption of the hormone by kaolin as in the method described by Scott. The active substance is adsorbed in acid condition (pH 4.0) by the kaolin and then isolated by elution with 0.1 N sodium hydroxide. The alkaline solution is then treated by Somogyi's copper reagent and the excess not reduced is titrated by 0,005 N sodium thiosulfate. Experiments were carried to demonstrate that the hormone is quantitatively adsorbed in pH 4.0 and eluted by the alkaline solution. The presence of the gonadotropic hormone was controlled in all cases by biological tests (Ascheim-Zondek and Friedman's tests). It was possible to obtain an approximate correlation between the biological and the chemical tests, the deviations not exceding more than 4,5 %. In pregnancy cases much better agreement was encountered and therefore the thiosulfate values could be expressed in mice units as shows Fig. 1. Recent pregnancy cases were detected with the chemical test and in two cases earlier than with the Friedman test. The economy of reagents and short time to performe the test speaks favorably to its adoption in routine laboratory work. The present test is based on 534 urine determinations.

BIBLIOGRAFIA

1. VOGE, C., 1929, A simple chemical test for pregnancy. *Brit. Med. J.*, 2: 829-830.
2. VISSCHER, J. P. & BOWMAN, D. E., 1933/1934, Chemical determination of pregnancy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 31:460-461.
3. HIRSHEIMER, A., 1939, The hippuric acid test in pregnancy. *Amer. J. Obstr. & Gynec.*, 37(3):363-376.
4. ZELLER, G. A., 1940, A simple color reaction for pregnancy detection. *Naturwiss.*, 28:712.
5. VENNING, E. H., 1937, Gravimetric method for the determination of sodium pregnandiol glucuronidate, an excretion product of progesterone. *J. Biol. Chem.*, 119(2):473-480.
6. BOWMAN, D. E., 1939, The use of a reducing factor of pregnancy urine in the diagnosis of pregnancy. *J. Lab. Clin. Med.*, 24:1072-1076.
7. MELLO, M. I., 1942, Modificação do test de Bowman para o diagnóstico da gravidez. *Rev. Brasil. Biol.*, 2(3):343-348.
8. MELLO, M. I., 1942, Nota sobre um novo test químico para o diagnóstico da gravidez. *Bol. Acad. Nac. Med.* (Em impressão).
9. SCOTT, L. D., 1940, The concentration and detoxification of human urine for biological pregnancy. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 21(6):320-324.
10. BOWMAN, D. E., 1941, Some of the oxidation reduction properties of the chorionic gonadotropic hormone. *J. Biol Chem.*, 137(1):293-302.

11. GURIN, S., BACHMAN, C. & WILSON, D. W., 1939, The nature of the carbohydrate in the gonadotropic substance of pregnancy urine. *Science*, 89:62-63.

12. GURIN, S., BACHMAN, C. & WILSON. D. W., 1939, The gonadotropic hormone of urine of pregnancy. A simple method of extraction and purification. *J. Biol. Chem.*, 128(2): 525-536.

13. GURIN, S., 1942, Carbohydrates of the gonadotropic hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49(1):48-50.

14. SOMOGYI, M., 1937, A reagent for the copper-iodometric determination of very small amounts of sugar. *J. Biol. Chem.*, 117:771-776.

15. HELLER, C. G. & HELLER, E. J., 1939, Gonadotropic hormone: Clinical application of extraction methods for essay purposes. *Endocrinol.*, 24:319-325.

16. KATZMAN, P. A. & DOISY, E. A., 1934, The quantitative determination of small amounts of gonadotropic material. *J. Biol. Chem.*, 106:125.

17. FREED, S. C. & HECHTER, O., 1936, The extraction of both the gonadotropic and (free or total) estrogenic hormones from a single urine sample. *Endocrinol.*, 20:396-397

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 127-133
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

AMOENITATES BIOLOGICAE

THE INFLUENCE OF LOUIS AGASSIZ ON THE ICHTHYOLOGY OF BRAZIL [1]

GEORGE S. MYERS

Stanford University, California, and Museu Nacional, Rio de Janeiro, D. F.

The name of LOUIS AGASSIZ is justly celebrated in Brazil. His *Journey in Brazil* is one of the most important of those great works on scientific exploration which so greatly enrich the history of the Brazilian people. First published in 1868, *A Journey in Brazil* has been known and read by generations of Brazilian intellectuals, and now its recent translation and publication in Brazil has made it available to those who read only the Portuguese language.

Unfortunately, the real scientific influence resulting from the work of AGASSIZ in Brazil is much less widely known, even to zoologists. There are several reasons for this. The foremost is the fact that *A Journey in Brazil* was published before there had been any adequate laboratory study of the collections made during the Thayer Expedition. Secondly, AGASSIZ died before any but the smallest part of the zoological collection had been studied, and no revision of the text of the original edition of the *Journey,* to incorporate notice of the later scientific results, was ever made. Thirdly, publication of the zoological results was delayed, in some instances for from twenty to fifty years after the end of the expedition. A thousand or more of the specimens of fishes, which have not yet been examined by any ichthyologist, are now in my hands for study. Finally, no serious attempt was made, except in geology, to report upon the results of the expedition in a uniform manner. The zoological papers were numerous, but scattered, and in large measure combined with the results of other expeditions, so that it is difficult, even for a professional zoologist, to trace the results of AGASSIZ's expedition through the maze of existing zoological literature.

On the other hand, the geological results of the Thayer Expedition are widely known and widely appreciated, especially in Brazil. AGASSIZ brought CHARLES FREDERICK HARTT to Brazil. That fortunate circumstance resulted in HARTT's famous work, *Geology and Physical Geography of Brazil,* the most important single contribution in the entire history of Brazilian geology. But the results were far wider and more extended than that. HARTT returned to Brazil to stay,

---

[1] Conferência pronunciada na sessão de 15 de Setembro de 1942 da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro, ocasião na qual o prof. G. MYERS ofereceu ao Museu Nacional vários desenhos inéditos com notas do próprio punho de AGASSIZ, um dos quais a REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA tem o prazer de divulgar (Nota Red.).

and he brought with him ORVILLE A. DERBY and JOHN CASPER BRANNER, who carried on HARTT's work and whose names will always be remembered with respect and affection by the Brazilian people. DERBY remained in Brazil and devoted his entire life to the study of Brazilian geology. BRANNER later returned to the United States, finally becoming professor of geology and then president of Stanford University, but he visited Brazil repeatedly and the greater part of his research was devoted to Brazilian geology. Thus the selection of HARTT as one of the Thayer Expedition assistants became one of the most important events in the scientific history of Brazil.

A similar fortunate circumstance led directly to the interest of AGASSIZ in South American fishes, an interest which was to have such a vast and important influence on both the zoology and the geology of Brazil. In 1827, a young Swiss naturalist of twenty years of age, named LOUIS AGASSIZ, came to Paris to study with CUVIER at the *Jardin des Plantes*. The ability of this young man was of such a character as to attract the attention of VON HUMBOLDT, and the great man recommended the young AGASSIZ to VON MARTIUS as a student capable of completing the unfinished work of SPIX upon Brazilian fishes. The result was the great folio volume of SPIX and AGASSIZ (1829) upon the fishes collected by SPIX and MARTIUS. In this chance way was born the deep and continued interest of AGASSIZ in the fishes of Brazil.

In the following years AGASSIZ was occupied with his epoch-making studies upon fossil fishes, his equally world-famed work upon the movement of glaciers, and numerous other studies. In 1846, when AGASSIZ came to the United States to lecture at the Lowell Institute in Boston, he was probably the most famous naturalist in the whole of Europe. His wide interest in all phases of zoology and geology had brought him in contact with almost every one of the foremost European scientists of his day, and his fame as a stimulating teacher, who could arouse the enthusiasm of everyone about him, was already great.

In the United States, AGASSIZ found a young country deeply interested in learning, but with few men competent to teach natural history. His lectures were received everywhere, not only with pleasure but with ovations. The opportunities for teaching and research in a new and relatively unexplored land finally captured the imagination of AGASSIZ, and in 1847 he decided to accept the offer of a professorship of natural history at Harvard, North America's oldest and foremost university, located in Cambridge, a suburb of Boston.

At Harvard, the university museum was a non-descript institution of no great importance. In fact, the whole of North America at that time did not possess more than one natural history museum of any consequence. That one was the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, but its collections were small and relatively provincial. The Smithsonian Institution in Washington, which gave birth in later years to the United States National Museum, was founded in 1847, but its collections remained small for many years. AGASSIZ realized the need for large natural history collections at Harvard and he immediately set about gathering them. During succeeding years the collections grew rapidly and AGASSIZ was forced, in 1852, to seek funds from outside the university for their care. Finally, AGASSIZ appealed to the State Legislature of Massachusetts for funds, a procedure at that time totally unknown and untried in North America. To the amazement of everyone, he obtained 100,000 dollars, a gigantic amount in those days, for the building of the first great university museum in North America. This building, planned as one wing of the still greater museum struc-

ture of today, was completed in 1860.[2] At about the same time AGASSIZ raised a sum of 70,000 dollars by private subscription for the use of the museum. This also was a method of securing funds scarcely used up until that time, and it testifies eloquently to the deep scientific fervor and personnal magnetism of AGASSIZ, and to the esteem in which the citizens of his new home held him. AGASSIZ named his museum the *Museum of Comparative Zoology*, and it retains that name to this day, in spite of the fact that its work embraces not only zoology, but geology and paleontology as well.

With a new building and funds which were temporarily ample, AGASSIZ proceeded with the building up of natural history collections which he hoped would provide as ample a field for scientific research at Harvard as existed in any of the great centers of learning in Europe. His wide acquaintance with scientific men everywhere, and his own persuasive personality, caused specimens to flow into the museum from many sources. Even Emperor Dom Pedro Segundo, who always showed a deep interest in natural history and who was well acquainted with the work of AGASSIZ, expressed warm sympathy with the objects of the new museum, and sent to Harvard collections made under his order expressly for this purpose.[3]

It was perhaps this circumstance that led AGASSIZ to plan a great expedition to obtain materials for a study of the fishes of Brazil, a subject in which he had retained his interest since those long-past days in Paris with HUMBOLDT and CUVIER. It is unnecessary in this place to give any extensive account of the organization of the expedition. Suffice it to say that the expedition was financially supported by Mr. NATHANIEL THAYER, who not only supplied the money required for the expenses of AGASSIZ and a corps of assistants, but also continued to meet the heavy expenses of the expedition until all the material had finally been stored in the museum. AGASSIZ took with him twelve assistants. The regular staff consisted of Professor and Mrs. AGASSIZ; Mr. JAMES BURCKHARDT, artist; Mr. JOHN G. ANTHONY, conchologist; Mr. FREDERICK C. HARTT and Mr. ORESTES ST. JONH, geologists; Mr. JOEL A. ALLEN, ornithologist; and Mr. GEORGE SCEVA, preparator. In addition, six volunteer assistants accompanied the party; they were: Mr. NEWTON DEXTER, Mr. WILLIAM JAMES, Mr. EDWARD COPELAND, Mr. THOMAS WARD, Mr. WALTER HUNNEWELL, and Mr. S. V. R. THAYER.[4]

The party arrived in Rio de Janeiro in April, 1865, and AGASSIZ was immediately extended the active and unsolicited aid of Dom Pedro II, who placed the services of a government ship at the disposal of the expedition and who even made collections of fishes personnally for the great naturalist.

While AGASSIZ and the main body of the expedition proceeded northward along the coast to Belém and ascended the Rio Amazonas, other members of the party collected in the coastal regions and interior of central Brazil. HARTT and COPELAND traversed the coastal areas and rivers between Rio and Bahía. ALLEN and ST. JOHN descended the Rio das Velhas and Rio São Francisco to

---

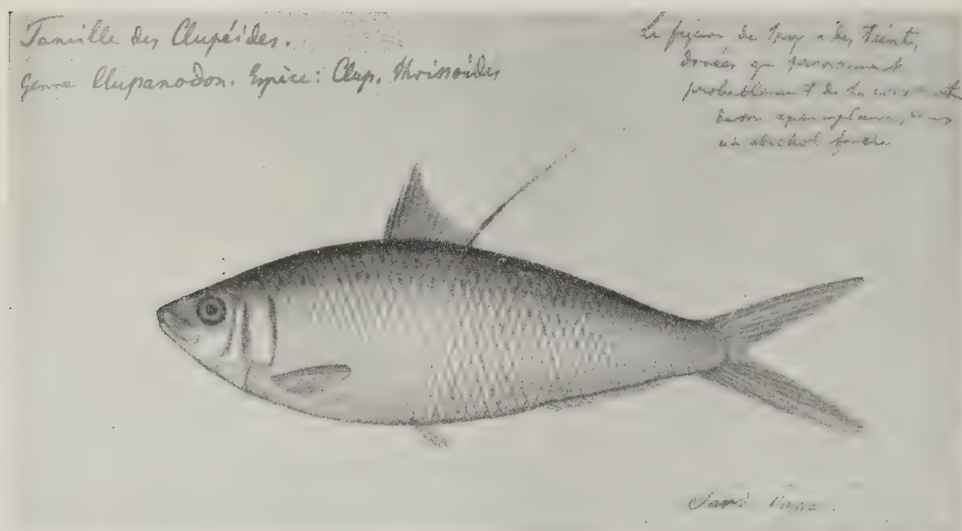
2 In the recent Brazilian translation of AGASSIZ's book (*Viagem ao Brasil*, S. Paulo, 1938), a photograph is presented, opposite p. 12, which is said to represent the "Museu de Cambridge (1865)". I do not know what this building may be but it is not the Museum as it appeared in 1865. At that time the Museum of Comparative Zoology was a large building of four floors and basement.

3 See p. V of the American edition; pp. 9-10 of the Brazilian edition, *Viagem ao Brasil*.

4 Some of the assistants on the Thayer Expedition later became famous themselves. HARTT became the founder of Brazilian geology, and the director of the first national geological survey of Brazil. ALLEN became one of the world's leading ornithologists. WILLIAM JAMES, in his chosen field of philosophy and experimental psychology, became as famous as AGASSIZ had been in natural history.

Barra, whence ALLEN went eastward to São Salvador and ST. JOHN travelled north to the Rio Parnahyba and Rio Itapicurú. WARD crossed from the basin of the São Francisco to the headwaters of the Rio Tocantins and descended that stream to Belém. The main party on the Rio Amazonas reached Tabatinga in September, thence returning downstream. Short excursions were made up the Rio Negro and Rio Tapajoz, and to Maués, and still shorter ones into the mouth of the Rio Trombetas and other streams and passages along the way. The expedition reassembled again in Rio de Janeiro in May and June, 1866, and left for the United States in the first part of July.

The Thayer Expedition made collections in many departments of natural history, but first attention was constantly given to fishes, of which the party assembled the finest series ever obtained in Brazil. During the whole of the expedition, the artist, BURCKHARDT, was engaged in making water-color sketches of the life-colors of the specimens collected.[5]



Photograph of water-color sketch of *Opisthonema oglinum* (Le Sueur) painted by BURCKHARDT under the direction of LOUIS AGASSIZ at Rio de Janeiro in 1865. The notations in the upper corners are in the handwriting of AGASSIZ. This drawing and some others from the Thayer Expedition are now in the Museu Nacional, Rio de Janeiro.

AGASSIZ's health was not good before the Thayer Expedition, and continued to be bad after his return. He busied himself with the many details of museum administration, and, foreseeing his own inability to study all of the Brazilian fishes he had obtained, he invited Dr. FRANZ STEINDACHNER of Vienna to come to the United States to work upon the collection. STEINDACHNER, who had published some excellent papers on the Brazilian fishes collected by NATTERER, came to Harvard in 1869 and immediately began work. He remained at Harvard for two or three years and when he returned to Vienna he took with him, as the gift of AGASSIZ, a large number of the Thayer fishes. STEINDACHNER published

[5] Several of these sketches, of fishes from the bay of Rio de Janeiro and from various localities on the Rio Amazonas, which have been in my personnal possession, were presented to the Museu Nacional in Rio de Janeiro upon the occasion at which this paper was presented before the Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro. The sketches bear locality data in the writing of BURCKHARDT, and notes upon identity written by AGASSIZ himself.

no papers on the Thayer fishes in the United States, but on his return to Austria, he began the publication of a series of important papers based principally or partly on them and partly on the collections of NATTERER and other Austrian collectors. Among these papers were STEINDACHNER's classical estudies upon *Die Süsswasser fische des Südöstlichen Brasilien, Beiträge zur Kenntniss der Chromiden des Amazonstromes, Brasilianische Siluroiden aus der Gruppe der Doradinen,* and several parts of his series of papers entitled *Ichthyologische Beiträge* and *Beiträge zur Kenntniss der Flüssfische Südamerikas.*

Before his death AGASSIZ was able to complete another great expedition, which enabled him again to visit Brazil. In the years 1871 and 1872, in the U. S. Coast Survey Steamer *Hassler,* AGASSIZ and STEINDACHNER circumnavigated the South American continent, collecting and dredging marine and deep-sea animals. STEINDACHNER obtained many more fresh-water fishes from Brazil and large collections of the marine fishes from all the coasts of South America, which he utilized extensively in his later papers. But the largest collections made by the Hassler Expedition consisted of marine invertebrates, and a great deal of what is known of the Echinodermata and other invertebrate groups of the Brazilian coast is contained in the great monographs published in the Memoirs of the Museum of Comparative Zoology at Harvard.

AGASSIZ died in 1873. STEINDACHNER had returned to Vienna. The only ichthyologist left at the Museum was one of AGASSIZ's young students, SAMUEL GARMAN. But GARMAN was only one of a small but remarkable group of students who had studied with AGASSIZ during the last year of the great master's life. In that year AGASSIZ had begun the first marine biological laboratory in the United States, located on Penekese Island off the coast of Massachusetts. Among this small group that studied that summer at Penekese were SAMUEL GARMAN, WILLIAM KEITH BROOKS, DAVID STARR JORDAN, SAMUEL SCUDDER, and others, many of whom became the dominant figures in North American zoology in later years, and all of whom felt that their brief association with AGASSIZ had had a profound effect upon their later lives. GARMAN went on to become the world's greatest authority on living elasmobranchs, BROOKS built up the great zoology department at Johns Hopkins University, SCUDDER became America's leading entomologist, and JORDAN became the founder and leader of the greatest and most prolific American school of ichthyologists. This school had a far-reaching effect upon South American ichthyology.

JORDAN became professor and later president of Indiana University, and drew into his ichthyological researches a number of students who later became his co-workers and colleagues. Among them were CHARLES HENRY GILBERT, BARTON WARREN EVERMANN, CARL H. EIGENMANN, and SETH EUGENE MEEK, names which are known in every laboratory in the world where fishes are studied. In 1891, JORDAN was appointed president of the great new university founded at Palo Alto, California, by Senator STANFORD. He took GILBERT with him as head of the department of zoology, and Stanford University soon became the world's most active center of ichthyological work. Here JORDAN developed a new crop of young ichthyologists, among them being such well known names as JOHN OTTERBEIN SNYDER, EDWIN CHAPIN STARKS, HENRY WEED FOWLER, ALBERT W. HERRE, and CARL L. HUBBS. At Indiana University, when JORDAN left, CARL H. EIGENMANN became head of the zoology department, and continued the ichthyological tradition of AGASSIZ and JORDAN; EIGENMANN here developed such students as W. L. MCATEE, CHARLES DRIVER, MAX M. ELLIS, A. W. HENN, JOHN D. HASEMAN, N. E. PEARSON, and W. R. ALLEN. The present writer was privileged to be the last ichthyological student of EIGENMANN, and of JORDAN as well.

JORDAN and his students, GILBERT, EVERMANN, and MEEK, laid down the firm foundation of great descriptive monographs upon which study of the marine fishes of North and South America still progresses. But JORDAN, and through him AGASSIZ, are responsible not only for this. Here again we must take cognizance of another chance contact, which, like AGASSIZ's meeting with HUMBOLDT, and the contacts of HARTT and of JORDAN with AGASSIZ, had a revolutionary effect upon South America scientific work.

When AGASSIZ died in 1873 and left the Museum of Comparative Zoology without a mature ichthyologist, study of the Thayer fishes languished except for the papers STEINDACHNER was publishing in Vienna. GARMAN was at Harvard, it is true, but he was young and had not settled down to concentrated work. Nor did GARMAN ever become deeply interested in South American fishes as such. He published great monographs on the Cyprinodonts and Elasmobranchii of the world, including in them the Thayer collections of these groups, but otherwise his contributions to South American ichthyology were small.

ALEXANDER AGASSIZ, who succeeded his father as director of the museum, was interested in seeing that the Thayer collections should produce useful scientific results commensurate with the time, energy, and money spent in collecting them, and he requested JORDAN to recommend an ichthyological student who could come to Harvard to work upon Brazilian fishes. JORDAN chose CARL H. EIGENMANN, and this choice was as important for South American ichthyology as the selection of HARTT as a Thayer Expedition assistant had been for Brazilian geology.

EIGENMANN went to Harvard in 1887, and, assisted by his wife, ROSA SMITH EIGENMANN, plunged immediately into active study of the Brazilian fishes. Although he had to leave to take his post at Indiana University in 1891 (see above), EIGENMANN did not cease his studies of South American fresh-water fishes until his death in 1927. The enormous series of papers and the great monographs that he produced upon South American fishes form an intensive and extensive body of research upon the fauna of one continent paralleled only by BOULENGER's investigations of the fresh-water fishes of Africa. Indeed it may be said that most of the other South American ichthyological papers of the last half-century would have lost half their value, or would never have been written, had their authors been deprived of the groundwork of revisional monographs written by EIGENMANN. EIGENMANN had only one peer in South American fresh-water ichthyology, FRANZ STEINDACHNER. But STEINDACHNER, although he excelled in the meticulous description of isolated species or specimens, never produced any revisional work or complete faunal monographs. The majority of his papers were collections of notes and descriptions (beautifully illustrated by his artist, KONOPICKY), frequently of fishes from all parts of the world, gathered together into heterogeneous "ichthyological contributions". He seldom even reported a collection *in toto*. On the other hand, EIGENMANN had a genius for revisional work, and his massive faunal monographs (based largely upon his own collections or upon material gathered by his students) on the fishes of British Guiana, Colombia, Ecuador, Perú, Patagonia, and Chile, and his great revisions of complete families (based, so far as Brazil is concerned, largely upon the Thayer collections) are the first work with which any worker on South American freshwater fishes must become familiar. EIGENMANN himself never collected fishes in Brazil, although he sent one of his students, HASEMAN, on a three year expedition to obtain fishes in those parts of Brazil not reached by AGASSIZ and his assistants. EIGENMANN did not lack interest in Brazil. It was simply that he had so much material from Brazil collected by AGASSIZ that he felt that his own

expeditions should be directed towards parts of the continent that were ichthyologically less well known.

Although it is impossible for any mortal man to tell what *might* have happened in the past if certain specific events had not occurred, it is interesting to speculate upon what might have happened if AGASSIZ had not met HUMBOLDT, if HARTT or JORDAN had not met AGASSIZ, or if JORDAN had selected someone other than EIGENMANN to study the Thayer fishes. South American ichthyology and geology might be in a very different state. But, leaving speculation aside, the influence of AGASSIZ upon the study of South American fishes is plain. Although he himself never published much upon South American fishes following the 1829 monograph of SPIX and AGASSIZ, it was AGASSIZ's spark of genius and his interest in Brazilian fishes that made possible the majority of the work that has been done.

The monument that ichthyology has erected to AGASSIZ and his influence upon Brazilian ichthyology lies not so much in his own publications and the value attached to them. It lies chiefly in the work of JORDAN and EIGENMANN, and the host of other students of South American fishes who studied under these men, work whose origins can be traced back intellectually to AGASSIZ and his meeting with VON HUMBOLDT.

SUMMARY

This paper traces the influence of LOUIS AGASSIZ on the study of Brazilian fishes, by presenting the history of AGASSIZ's first interest in the subject of his work and his expeditions, and of the work of his students and their students on South American ichthyology. It shows that the influence exerted by AGASSIZ was not so much wielded by his own publications as by the interest in fishes he created in others and the opportunities for research made available by the collections he gathered during the Thayer Expedition in 1865 and 1866. The principal contributions to the ichthyology of Brazil resulted from the influence of AGASSIZ.

RESUMO

Este trabalho traça a influência de LOUIS AGASSIZ no estudo dos peixes brasileiros, apresentando a história de seu primitivo interesse no assunto, de seu trabalho nas expedições que realizou e do trabalho de seus discípulos e dos discípulos que estes formaram na Ictiologia Sul-Americana. Mostra que a influência exercida por AGASSIZ não foi tanto por suas próprias publicações quanto pelo interesse que ele creou em outros e pelas oportunidades de pesquisa que ele proporcionou com o material colecionado durante a Expedição Thayer em 1865 e 1866. As principais contribuições para a Ictiologia do Brasil resultaram, então, da influência de AGASSIZ.

Rev. Brasil. Biol., 3(1): 135-137
Março, 1943 — Rio de Janeiro, D. F.

NOTÍCIAS E COMENTÁRIOS

REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA

A REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA inicia seu 3.º ano de vida sob o signo de Marte, mas não a aflige o futuro. Nascida em plena guerra mundial devastadora e iníqua, contrária a todos os sentimentos e anseios da Ciência, mòrmente da Ciência da Vida, habituou-se às situações dificeis dos tempos atuais e conserva intangivel sua orientação inicial.

Não aceitando preconceitos de raça, nacionalidade e religião, sensivel ao valor do Saber e do Trabalho, tem visto sua orientação técnica e material admirada e elogiada por personalidades várias em diversas partes do mundo onde ainda é possivel atingir.

Não existirão, portanto, modificações sensiveis em seu aspecto, a não ser aquelas que redundarem em melhoria acentuada. Fazemos votos, porisso, para que seus amigos e colaboradores continuem a prestar o auxílio até aqui concedido ao magnífico empreendimento da Sociedade de Biologia do Brasil que a benemerência de GUILHERME GUINLE ampara e estimula.

A REVISTA DE BIOLOGIA DO BRASIL conserva para si mais um motivo de satisfação, ao verificar que vários membros de seu Conselho Científico foram distinguidos com honrosas comissões técnicas, que denunciam o valor de cada um. Com a recente reorganização do Instituto Oswaldo Cruz e publicação de seu novo Regimento, foram designados :

Dr. CARLOS B. MAGARINOS TORRES, chefe da Divisão de Patologia; Dr. GILBERTO G. VILLELA, chefe da Divisão de Química e Farmacologia; Dr. MIGUEL OZORIO DE ALMEIDA, chefe da Divisão de Fisiologia; Dr. LAURO TRAVASSOS, chefe da Divisão de Zoologia Médica e substituto do Diretor; Dr. OCTAVIO DE MAGALHÃES, chefe da Secção de Estatística e Epidemiologia da Divisão de Estudos de Endemias; e Dr. THALES MARTINS, chefe da Secção de Endocrinologia da Divisão de Fisiologia.

Em outro setor de atividades, como membro do Conselho Consultivo da Coordenação da Mobilização Econômica, designado pelo Sr. Pre-

sidente da República, encontra-se o Dr. ARTHUR NEIVA emprestando uma vez mais sua importante colaboração ao País em ocasião dificil como a atual.

Em 12 de Janeiro p.p. reuniu-se o Conselho Científico da Revista a-fim-de tomar conhecimento do relatório que a Comissão de Redação apresentou sôbre as atividades realizadas durante o ano de 1942; este relatório, que a seguir transcrevemos, foi aprovado; e louvado, por proposta do Dr. MIGUEL OZORIO DE ALMEIDA, o apuro com que a Comissão de Redação se desobrigou de suas funções.

Ilmos. Srs. Membros do Conselho Científico da REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA.

É nossa obrigação relatar-vos os trabalhos da Comissão de Redação no decorrer do ano de 1942.

Neste período tivemos duas grandes preocupações : publicar o volume 2 dentro dos mesmos moldes que havíamos traçado para a REVISTA e que se achavam consubstanciados na apresentação do volume 1, e dar à nossa organização uma posição legal estavel que facilitasse a resolução das dificuldades que vinham surgindo.

O volume 2 foi publicado com 521 páginas, tendo um acréscimo sôbre o anterior de 48 páginas, encerrando um total de 69 artigos originais (2 menos do que no volume anterior), de 65 autores diferentes (um excesso de 12 sôbre o volume 1). Os assuntos versaram sôbre aspectos variados da Biologia, e todos os trabalhos entregues à Redação, com exceção de 2 recusados pelo Conselho Científico, foram publicados.

80 exemplares da REVISTA foram destinados aos sócios da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro e 34 aos da de Minas Gerais; 50 exemplares gratuitos foram enviados às revistas de referência e a instituições da América Latina que solicitaram permuta (do volume 1 enviamos sómente 25 exemplares nestas condições), assim distribuidos : 10 para os Estados Unidos da América. 8 para Inglaterra, 4 para Argentina, 4 para México, 2 para Bolívia, 1 para Venezuela, 1 para Uruguay, 1 para Paraguay, 1 para Chile, 1 para Colômbia, 10 para Rio de Janeiro, 6 para S. Paulo e 1 para Minas Gerais.

Foram 56 os assinantes da REVISTA, 38 no Brasil (17 no Rio, 14 em S. Paulo, 2 em Pernambuco, 1 no Pará, 1 no Rio Grande do Sul, 1 no Estado do Rio, 1 no Piauí, e 1 em Minas Gerais) e 18 no extrangeiro (13 nos Estados Unidos, 2 na Argentina, 1 na Bolívia, 1 no Panamá e 1 no Hawaii).

O resumido balancete anexo demonstrará o movimento financeiro até o dia 31 de Dezembro de 1942 :

RECEITA :		
Saldo do ano anterior (desde 20-1-942)	Cr$	4.683,80
Contribuição do Dr. Guilherme Guinle		28.000,00
Contribuição Sociedade Biologia Rio de Janeiro		
6 anuidades de 1941		240,00
78 anuidades de 1942		3.120,00
Contribuição da Sociedade de Biologia de S. Paulo		
2.º semestre de 1941		896,00
Anuidades 1942 e páginas excedentes		2.912,70
Contribuição Sociedade de Biologia de Minas Gerais		1.360,00
Assinaturas e venda avulsa (incl. chèques recebidos)		5.614,00
Separados excedentes		1.467,00
Juros		526,30
Total da RECEITA	Cr$	48.819,80
DESPEZA :		
Impressão do número 1	Cr$	7.131,80
Impressão do número 2		6.638,00
Impressão do número 3		6.055,00
Impressão do número 4		7.823,80
Total do acréscimo pago pelos separados excedentes		1.510,00
Registro Sociedade de Biologia do Brasil		753,00
Registro da REVISTA e honorários advogado		633,40
Doação da Revista feita pelo Dr. G. Pacheco à Socied. de Biologia do Brasil		1.430,00
Material de secretaria, tesouraria, expedição e propaganda		964,60
Total da DESPEZA	Cr$	32.939,60
SALDO em 31 de Dezembro de 1942	Cr$	15.880,20

Estes dados ilustram o trabalho realisado pela Comissão de Redação, que conseguiu aumentar de três vêzes e pouco o saldo do ano anterior, as despezas tendo sido acrescidas com o novo registro da REVISTA em nome da Sociedade de Biologia do Brasil que foi também registrada à custa da REVISTA e com a quantia paga ao advogado que tratou de nossos interesses e do processo de doação que fomos obrigados a promover.

Os cheques recebidos do extrangeiro que não haviam sido aceitos devido a situação irregular em que nos encontrávamos, foram todos pagos, agora, pelo Banco do Brasil.

A aceitação da REVISTA cresce cada vez mais e são bastante numerosos e sugestivos os documentos que possuimos a respeito e que oportunamente divulgaremos. Conseguimos realisar, com algumas dificuldades, uma obra destinada a perdurar e vimos empregando nossos esforços neste sentido com a máxima boa vontade e sentido de cooperação. Os obstáculos opostos ao nosso desiderato serão vencidos e só trarão mais um motivo de confiança para cada um de nós.

Queremos ressaltar, entretanto, no momento, a proposta de cooperação que nos fez o Conselho Britânico, já noticiada em o número 4 do volume 2, como um índice do modo pelo qual a REVISTA é observada e admirada no extrangeiro.

Novas dificuldades teremos a resolver este ano, oriundas do aumento do custo do papel e de outras matérias necessárias à impressão da REVISTA, mas esperamos resolvê-las dentro de nossas possibilidades materiais.

Seria supérfluo incluir neste relatório uma palavra de agradecimento ao Dr. Guilherme Guinle, à quem devemos a existência e a manutenção desta publicação.

No decorrer do ano passado, deixou seu lugar na Comissão de Redação, o nosso colega Dr. Humberto Cardoso, que foi substituido pelo Dr. J. F. Teixeira de Freitas que, de acordo com dispositivo regulamentar, será o secretário da Comissão de Redação para 1943. Entretanto, devido a entendimento realisado entre os membros desta Comissão, serão mantidas as tarefas inicialmente atribuidas a cada um.

Todos os comprovantes das despezas realisadas, arquivo de correspondência e fichários achamse à disposição dos Srs. membros do Conselho Científico, à quem agradecemos mais uma vez a colaboração prestada, solicitando aprovação de nosso trabalho.

A Comissão de Redação
Mario Vianna Dias
J. F. Teixeira de Freitas
Herman Lent

Com este número iniciamos uma nova secção, intitulada **Amoenitates Biologicae**, na qual publicaremos artigos, palestras e conferências que não possam ser considerados como trabalhos originais de pesquisa, mas que se relacionem a vultos e fatos da Biologia e adicionem alguma documentação ao assunto proposto.

A Sociedade de Biologia de Minas Gerais elegeu sua nova diretoria para 1943, assim constituida : Presidente: Octavio de Magalhães; vice-presidente: Aroeira Neves; 1.º secretário: Moacyr Junqueira; 2.º secretário: Paulo Borges; tesoureiro: Adyr Rocha; conselho consultivo: J. Alvim, Bernardo F. Magalhães e Aulo P. Viégas.

A Sociedade de Biologia de São Paulo elegeu sua nova diretoria para 1943, que ficou assim constituida : Presidente: J. Ribeiro do Valle; vice-presidente: Odorico Machado de Souza; secretário geral : M. Barros Erhart; 1.º secretário: John Lane; 2.º secretário; Luis Augusto Ribeiro do Valle; tesoureiro: João Pereira Junior; bibliotecário: Jorge Andrade Maia.

A Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro elegeu a seguinte diretoria para o exercício de 1943: C. B. Magarinos Torres, presidente; J. G. Lacorte, vice-presidente; Mario Vianna Dias 1.º secretário; Mario Ferreira dos Santos, 2.º secretário; J. F. Teixeira de Freitas, tesoureiro; Lauro Travassos, Miguel Ozorio de Almeida e H. C. de Souza Araujo, comissão de sindicância.

IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO — 1943